



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/00, C12Q 1/68, C12P 21/02, A61K 48/00, 38/17, 45/00, 31/70</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/14210</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月16日(16.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04853</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月7日(07.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/252683 1998年9月7日(07.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 中外分子医学研究所(CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)(JP/JP) 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 根津淳一(NEZU, Jun-ichi)(JP/JP) 奥 飛鳥(OKU, Asuka)(JP/JP) 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: SYSTEMIC CARNITINE DEFICIENCY GENE AND UTILIZATION THEREOF</p> <p>(54)発明の名称 全身性カルニチン欠乏症遺伝子およびその利用</p> <p>(57) Abstract It is clarified that OCTN2 gene participating in the organic cation transportation is a gene causative of systemic carnitine deficiency. It is also found that systemic carnitine deficiency can be examined by detecting whether or not this gene has mutation. It is furthermore found that patients with systemic carnitine deficiency can be treated by using normal OCTN2 gene, its protein, etc.</p>		

(57)要約

有機カチオンの輸送に関与する OCTN2 遺伝子が、全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子であることを突きとめた。この遺伝子に変異が存在するか否かを検出することにより、全身性カルニチン欠乏症の検査を行うことが可能であることを見出した。さらに、正常な OCTN2 遺伝子やそのタンパク質等を利用して全身性カルニチン欠乏症患者の治療を行うことも可能であることを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FR	フランス	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LS	レソト	SK	スロヴァキア
HA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GD	グレナダ	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GE	グルジア	LV	ルクトセンプルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MA	モロッコ	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GM	ギニア	MC	モナコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GN	ギニア・ビサウ	MD	モルドヴァ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MK	マケドニア	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー		共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	ID	インドネシア	ML	マリ	TR	トルコ
CC	中央アフリカ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	UG	ウクライナ
CH	スイス	IN	インド	MW	マラウイ	US	ウガンダ
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UZ	米国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NE	ニジェール	VN	ウズベキスタン
CN	中国	JP	日本	NL	オランダ	YU	ヴィエトナム
CR	コスタ・リカ	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZA	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		ジンバブエ
CZ	チェッコ	KR	韓国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ			RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明細書

全身性カルニチン欠乏症遺伝子およびその利用

技術分野

本発明は、全身性カルニチン欠乏症の検査および治療に用いられる分子、並びに全身性カルニチン欠乏症の検査方法に関する。

背景技術

全身性カルニチン欠乏症(Systemic Carnitine Deficiency, SCD)は骨格筋疾患および心筋疾患を主徴候とする常染色体劣性遺伝を示すヒトの遺伝病 (NIM 212140) である (Roe, C.R. & Coates, P.M. Mitochondrial fatty acid oxidation disorder. in The metabolic and molecular bases of inherited diseases 7th ed (eds Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. McGraw-Hill, New York, pp 1508-1509 1995)、Karpati, G. et al. The syndrome of systemic carnitine deficiency: clinical, morphologic, biochemical, and pathophysiologic features. Neurology 25, 16-24 (1975))。この症候群の患者の血清カルニチンレベルや組織内カルニチンレベルは健常人と比較し著しく低いことが知られている。カルニチンは長鎖脂肪酸代謝に必要なコファクターである。細胞内の脂肪酸はカルニチンを介した機構によりミトコンドリアの外膜、内膜を通過できるようになり、ミトコンドリア内において β 酸化を受け、エネルギーが産生される (Walter, J.H. L-Carnitine. Arch Dis Child 74, 475-478 (1996)、Bremer, J. Carnitine metabolism and functions. Physiol Rev 63, 1420-1480 (1983))。全身性カルニチン欠乏症患者においてはその異常なカルニチン濃度の低下が、筋肉といったエネルギーを大量に必要とする組織の疾患に対する直接の原因になっていると考えられる。全身性カルニチン欠乏症患

者から得られた繊維芽細胞を用いた膜生理学的な研究からは、これらの細胞においてはカルニチンを細胞外から細胞内へ輸送する機構が欠損していることが示されており、この機構に関与するタンパクをコードする遺伝子が、この遺伝病の原因遺伝子であると推測されている (Tein, I. et al. Impaired skin fibroblast carnitine uptake in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy. *Pediatr Res* 28, 247-255 (1990))。しかしながら、全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子はいまだ単離されていない。

発明の開示

本発明は、全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子を提供することを課題とする。さらに、本発明は、全身性カルニチン欠乏症の検査および治療に用いられる分子、並びに全身性カルニチン欠乏症の検査方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、有機カチオンの輸送に関与するタンパク質をコードする複数の遺伝子を単離し、これら遺伝子の中に、カルニチンをナトリウムイオン依存的に輸送する活性を有するヒト遺伝子 (ヒト OCTN2 遺伝子) およびこれに対応するマウス遺伝子 (マウス OCTN2 遺伝子) を見出している (特願平 9-260972 号、特願平 10-156660 号)。本発明者らは、単離した OCTN2 遺伝子が全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子である可能性があると考え、その検証を行った。

具体的には、全身性カルニチン欠乏症のモデルマウスおよび全身性カルニチン欠乏症患者における OCTN2 遺伝子の塩基配列の解析を行った。その結果、本発明者らは、該モデルマウスおよび全身性カルニチン欠乏症患者の双方において、OCTN2 遺伝子に種々の変異が存在することを見出した。即ち、本発明者らは、全身性カルニチン欠乏症が OCTN2 遺伝子の変異により発症することを世界で初めて解明することに成功した。

そして、この OCTN2 遺伝子の変異と全身性カルニチン欠乏症との密接な関係から、本発明者らは、患者の OCTN2 遺伝子に変異が存在するか否かを検出することにより、全身性カルニチン欠乏症の検査を行うことが可能であることを見出した。

さらに、本発明者らは、正常な OCTN2 遺伝子やそのタンパク質を利用して全身性カルニチン欠乏症患者の治療を行うことも可能であることを見出し、これにより本発明を完成するに至った。

従って、本発明は、全身性カルニチン欠乏症の検査および治療に用いられる分子、並びに全身性カルニチン欠乏症の検査方法に関し、より具体的には、

(1) 配列番号：5 に記載の塩基配列からなる DNA またはその転写制御領域にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有する、全身性カルニチン欠乏症の検査に用いるための DNA、

(2) 全身性カルニチン欠乏症の治療に用いるための下記 (a) から (c) のいずれかに記載の分子、

(a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の活性を促進する化合物。

(c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(3) (2) に記載の分子を有効成分とする、全身性カルニチン欠乏症治療薬、

(4) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する抗体を有効成分とする、全身性カルニチン欠乏症検査薬、

(5) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA またはその転写制御領域における変異を検出することを特徴とする、全身性カルニチン欠乏症の検査方法、

(6) (5) に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、

- (a) 患者から DNA 試料を調製する工程、
 - (b) (1) に記載の DNA をプライマーとして用いて患者由来の DNA を増幅する工程、
 - (c) 増幅した DNA を切断する工程、
 - (d) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程、
 - (e) 分離した DNA 断片に対し、検出可能な標識をした (1) に記載の DNA をプローブとしてハイブリダイズさせる工程、および
 - (f) 検出された DNA 断片の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む方法、
- (7) (5) に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、
- (a) 患者から RNA 試料を調製する工程、
 - (b) 大きさに応じて調製した RNA を分離する工程、
 - (c) 分離した RNA に対し、検出可能な標識をした (1) に記載の DNA をプローブとしてハイブリダイズさせる工程、および
 - (d) 検出された RNA の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む方法、
- (8) (5) に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、
- (a) 患者から DNA 試料を調製する工程、
 - (b) (1) に記載の DNA をプライマーとして患者由来の DNA を増幅する工程、
 - (c) 増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる工程、
 - (d) 解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程、および
 - (e) 分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法、
- (9) (5) に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、
- (a) 患者から DNA 試料を調製する工程、
 - (b) (1) に記載の DNA をプライマーとして患者由来の DNA を増幅する工程、

(c) 増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程、および

(d) 分離した DNA のゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法、を提供するものである。

本発明は、全身性カルニチン欠乏症が「OCTN2」と名付けられた遺伝子の変異に起因して発症するという本発明者等による知見に基づく。本発明は、第一に、全身性カルニチン欠乏症の検査に用いられる分子および該分子を利用した全身性カルニチン欠乏症の検査方法に関する。

本発明において、全身性カルニチン欠乏症の検査に用いられる分子としては、OCTN2 をコードするゲノム DNA 領域（例えば、配列番号：5）またはその制御領域（イントロン配列、プロモーター、エンハンサー配列も含む）の塩基配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド（プローブおよびプライマー）が利用される。

該オリゴヌクレオチドは、好ましくは OCTN2 をコードするゲノム DNA 領域またはその制御領域の塩基配列に特異的にハイブリダイズするものである。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（例えば、サムブルックら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第2版 1989 に記載の条件）で、他のタンパク質をコードする DNA とクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを指す。

プライマーとして用いられる場合、オリゴヌクレオチドは、通常、15bp～100bp であり、好ましくは 17bp～30bp である。プライマーは、OCTN2 遺伝子またはその発現を調節する領域の少なくとも一部を増幅しうるものであればいかなるものでもよい。このような領域としては、例えば、OCTN2 遺伝子のエキソン領域、イントロン領域、プロモーター領域、エンハンサー領域が含まれる。

一方、プローブとしてのオリゴヌクレオチドは、合成オリゴヌクレオチドで

あれば、通常、少なくとも 15bp 以上の鎖長を有する。プラスミド DNA などのベクターに組み込んだクローンから得た二本鎖 DNA をプローブとして用いることも可能である。プローブとしては、OCTN2 遺伝子またはその発現を調節する領域の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするものあればいかなるものでもよい。プローブがハイブリダイズする領域としては、例えば、OCTN2 遺伝子のエキソン領域、イントロン領域、プロモーター領域、エンハンサー領域が含まれる。プローブとして用いる場合、オリゴヌクレオチドあるいは二本鎖 DNA は適宜標識して用いられる。標識する方法としては、例えば、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いてオリゴヌクレオチドの 5' 端を ^{32}P でリン酸化することにより標識する方法や、クレノウ酵素などの DNA ポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドなどをプライマーとして ^{32}P などのアイソトープや、蛍光色素あるいはビオチンなどによって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法など）が挙げられる。

本発明において「全身性カルニチン欠乏症の検査」とは、OCTN2 遺伝子の変異に起因して全身性カルニチン欠乏症の症状を発現している患者の検査のみならず、被験者が OCTN2 遺伝子の変異に起因する全身性カルニチン欠乏症にかかりやすいか否かを判断するために行う、OCTN2 遺伝子の変異の検査も含まれる。すなわち、OCTN2 対立遺伝子の片方に変異が生じることにより、表面上は未だ症状を発現していない場合においても、全身性カルニチン欠乏症にかかる危険性が非常に増大しているものと考えられる。このような片方の OCTN2 対立遺伝子に変異を持つ患者（キャリアー）を特定するための検査も含まれる。

本発明におけるこれらヌクレオチドを利用した全身性カルニチン欠乏症の検査は、OCTN2 遺伝子またはその転写制御領域の変異を検出することを特徴とする。本発明の検査方法の一つの態様は、患者の OCTN2 遺伝子の塩基配列を直接決定する方法である。例えば、上記ヌクレオチドをプライマーとして、OCTN2 の変異に起因する疾患の疑いのある患者から単離した DNA を鋳型として、

PCR(Polymerase Chain Reaction)法などにより、患者の OCTN2 遺伝子の一部もしくは全部を増幅し、その塩基配列の決定を行う。これを健常者の OCTN2 遺伝子の配列と比較することにより、OCTN2 遺伝子の変異に起因する疾患を検査することができる。

本発明の検査方法としては、このように直接患者由来の DNA の塩基配列を決定する方法以外に種々の方法が用いられる。その一つの態様は、(a)患者から DNA 試料を調製する工程、(b)本発明のプライマーを用いて患者由来の DNA を増幅する工程、(c)増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる工程、(d)解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程、および(e)分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む。

このような方法として、PCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型)法(Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.、Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene. 1991 Aug 1; 6(8): 1313-1318.、Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling.、PCR Methods Appl. 1995 Apr 1; 4(5): 275-282.)が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また試料の量も少なくすむなどの利点を有するため、特に多数の DNA サンプルをスクリーニングするのに好適である。その原理は以下の如くである。二本鎖 DNA 断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離した DNA 鎖を変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖 DNA が異なる位置に移動する。一塩基の置換によってもこの一本鎖 DNA の高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の

変化を検出することにより DNA 断片に点突然変異や欠失、あるいは挿入などによる変異が存在することを検出することができる。

具体的には、まず、OCTN2 遺伝子の一部、あるいは全部を PCR 法などによって増幅する。増幅される範囲としては、通常 200~400bp 程度の長さが好ましい。また、増幅される領域としては、OCTN2 遺伝子の全てのエキソン、全てのイントロンの他、OCTN2 遺伝子のプロモーター、エンハンサーも含まれる。PCR の反応条件は、例えば、実施例 1 に記載の条件で行うことができる。PCR による遺伝子断片増幅の際、 ^{32}P などのアイソトープ、あるいは蛍光色素やビオチンなどによって標識したプライマーを用いるか、あるいは PCR 反応液に ^{32}P などのアイソトープ、あるいは蛍光色素やビオチンなどによって標識した基質塩基を加えて PCR を行うことによって合成される DNA 断片を標識する。あるいは PCR 反応後にクレノウ酵素などを用いて ^{32}P などのアイソトープ、あるいは蛍光色素やビオチンなどによって標識した基質塩基を合成された DNA 断片に付加することによっても標識を行うことができる。こうして得られた標識された DNA 断片を熱を加えることなどにより変性し、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量（5 から 10% 程度）のグリセロールを添加することにより、DNA 断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各 DNA 断片の性質により変動するが、通常、室温（20 から 25°C）で行い、好ましい分離が得られないときには 4 から 30°C までの温度で最適の移動度を与える温度の検討を行う。電気泳動後、DNA 断片の移動度を、X 線フィルムを用いたオートラジオグラフィーや、蛍光を検出するスキャナー等で検出し、解析する。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCR によって再度増幅し、それを直接シーケンシングすることにより、変異の存在を確認することができる。また、標識した DNA を使わない場合においても、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドや銀染色法などによって染色することによって、バン

ドを検出することができる。

本発明の検査方法の他の態様は、(a)患者から DNA 試料を調製する工程、(b)本発明のプライマーを用いて患者由来の DNA を増幅する工程、(c)増幅した DNA を切断する工程、(d) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程、(e) 分離した DNA 断片に対し、検出可能な標識をした本発明のプローブ DNA をハイブリダイズさせる工程、および (f) 検出された DNA 断片の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む。

このような方法としては、制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP) を利用した方法、PCR-RFLP 法などが挙げられる。DNA を切断する酵素としては、通常、制限酵素を用いる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じる DNA 断片内に塩基挿入、または欠失がある場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが健常者と比較して変化する。この変異を含む部分を PCR 法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、染色体 DNA をこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、本発明のプローブ DNA を用いてサザンブロッティングを行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は、それぞれの変異に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノム DNA 以外にも患者から調製した RNA を逆転写酵素で cDNA にし、これをそのまま制限酵素で切断した後サザンブロッティングを行うこともできる。また、この cDNA を鋳型として PCR で OCTN2 遺伝子の一部、あるいは全部を増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることもできる。

また、患者から調製した DNA の代わりに RNA を用いても同様に検出することが可能である。このような方法は、(a) 患者から RNA 試料を調製する工程、(b) 大きさに応じて調製した RNA を分離する工程、(c) 分離した RNA に対し、検出

可能な標識をした本発明のプローブ DNA をハイブリダイズさせる工程、および (d) 検出された RNA の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む。具体的な方法の一例としては、患者から調製した RNA を電気泳動し、本発明のプローブを用いてノーザンブロッティングを行い、移動度の差を検出する。

本発明の検査方法の他の態様は、(a)患者から DNA 試料を調製する工程、(b)本発明のプライマーを用いて DNA を増幅する工程、(c)増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程、および (d)分離した DNA のゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法である。

このような方法としては、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (denaturant gradient gel electrophoresis: DGGE) が挙げられる。OCTN2 遺伝子の一部、あるいは全部を本発明のプライマーなどを用いた PCR 法などによって増幅し、これを尿素などの変性剤の濃度が移動するに従って徐々に高くなっているポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、健常者と比較する。変異が存在する DNA 断片の場合、より低い変性剤濃度位置で DNA 断片が一本鎖になり、極端に移動速度が遅くなるため、この移動度の差を検出することにより変異の有無を検出することができる。

これら方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド (Allele Specific Oligonucleotide/ASO) ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと試料 DNA でハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法などにより検出できる。また、リボヌクレアーゼ A ミスマッチ切断法による検出も可能である。具体的には、OCTN2 遺伝子の一部、あるいは全部を PCR 法などによって増幅し、これをプラスミドベクター等に組み込んだ OCTN2 cDNA 等から調製した標識 RNA とハイ

ブリダイゼーションを行う。変異が存在する部分においてはハイブリッドが一本鎖構造となるので、この部分をリボヌクレアーゼ A によって切断し、これをオートラジオグラフィーなどで検出することによって変異の存在を検出することができる。

本発明は、また、OCTN2 タンパク質に結合する抗体を有効成分とする、全身性カルニチン欠乏症の検査薬に関する。OCTN2 タンパク質に結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、OCTN2 タンパク質（天然のタンパク質の他、GST との融合タンパク質として大腸菌において発現させた OCTN2 タンパクのような、適当な宿主細胞（大腸菌、酵母、哺乳類細胞）によって発現させたりコンビナント OCTN2 タンパク質を用いることもできる）若しくはその部分ペプチドをウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、OCTN2 タンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、OCTN2 タンパク質若しくはその部分ペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、OCTN2 タンパク質に結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、OCTN2 タンパク質や合成ペプチドをカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。抗体を検査薬として用いる場合、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、安定剤（BSA やゼラチンなど）、保存剤等を必要に応じて混合

する。全身性カルニチン欠乏症の検査としては、例えば、患者から採取した組織、あるいは単離した細胞を、酵素標識抗体法、蛍光標識抗体法などの方法で染色し、OCTN2 タンパク質の欠損、あるいは異常蓄積、または異常な細胞内分布の検査を行う。全身性カルニチン欠乏症患者から採取した組織、あるいは単離した細胞から細胞抽出液を作製し、これを SDS-PAGE などの方法により分離し、ニトロセルロース膜や PVDF 膜等にタンパクを転写した後、これを上記酵素抗体法等により染色する方法（ウエスタンブロッティング、イムノブロッティング）によっても検査を行うことができる。

また、本発明は、全身性カルニチン欠乏症の治療薬に関する。その一つの態様は、OCTN2 遺伝子を有効成分とする。OCTN2 遺伝子を治療薬として用いる場合、OCTN2 染色体 DNA の全長若しくは一部、または OCTN2 cDNA を適当なベクター、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、あるいはプラスミド DNA などに組み込み、経口投与、静脈内投与、患部への局所投与等により患者に投与する。投与方法としては、インビボ法その他、エクスビボ法を用いることも可能である。投与において、リン脂質などをミセル化して作製したリポソームに遺伝子を封入することにより、組織移行性、組織吸収性を高めることもできる。またカチオン性の脂質を加え、遺伝子 DNA と複合体を形成させることにより、組織移行性、組織吸収性を高めることも可能である。これにより患者体内における変異した OCTN2 遺伝子を正常な遺伝子に置換したり、また、正常な遺伝子を付加的に患者に投与することが可能であり、その結果、全身性カルニチン欠乏症の治療を行うことができる。

本発明の全身性カルニチン欠乏症の治療薬に関する他の態様は、OCTN2 タンパク質を有効成分とする。ヒト OCTN2 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：1 に、マウス OCTN2 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：3 に示す。OCTN2 タンパク質は、天然のタンパク質として、また遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。天然のタンパク質は、当業者

に周知の方法、例えば、OCTN2 タンパク質の部分ペプチドに対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、OCTN2 タンパク質発現の高い組織や細胞（例えば、胎児腎臓）から単離することが可能である。一方、組換えタンパク質は、例えば、OCTN2 タンパク質をコードする DNA（例えば、配列番号：2）で形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS 細胞、CHO 細胞、NIH3T3 細胞などの哺乳類細胞、Sf9 細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌（*E. coli*）が挙げられる。また、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしては pcDNA3（Invitrogen 社製）や pEF-BOS（*Nucleic Acids. Res.* 1990, 18 (17), p5322）などが、昆虫細胞のベクターとしては「BAC-to-BAC baculovirus expression system」（GIBCO BRL 社製）などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」（Invitrogen 社製）などが、大腸菌のベクターとしては pGEX-5X-1（Pharmacia 社製）、「QIAexpress system」（Qiagen 社製）などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、カチオニックリポソーム DOTAP（ベーリンガーマンハイム社製）や SuperFect（Qiagen 社製）を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法など用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

得られた OCTN2 タンパク質を全身性カルニチン欠乏症の治療薬として用いる場合には、OCTN2 タンパク質を直接投与することもできるが、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することもできる。例えば、薬剤として一般的に用いられる担体または媒体、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、安定剤、保存剤等と適宜組み合わせ、投与しうる。

投与量は、患者の体重、年齢、健康度、あるいは投与方法などの諸要因に応じて変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することができる。通常、 $0.01\text{mg/kg} \sim 1000\text{mg/kg}$ の範囲内である。投与は、経口投与、静脈投与、筋肉内投与、皮下投与などの方法で行うことができる。なお、本発明の薬剤の活性や安定性などを高めるための、OCTN2 タンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸の置換、アミノ酸の付加、欠失は、当業者であれば公知の方法、例えば、例えば、PCR による部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland)、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法 (Kramer, W. and Fritz, HJ (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367)、Kunkel 法 (*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)) などにより、容易に行うことができる。このような改変 OCTN2 タンパク質も本発明の薬剤に用いることが可能である。

全身性カルニチン欠乏症の治療薬に関する他の態様は、OCTN2 タンパク質の活性を促進する化合物を有効成分とする。OCTN2 タンパク質の活性を促進する化合物のスクリーニングは、以下のように行うことができる。例えば、OCTN2 タンパク質を発現するプラスミドを構築し、これをリン酸カルシウム法により、HEK293 細胞に導入する。この形質転換体に対し、放射標識したカルニチンおよび被検化合物を添加し、細胞内へのカルニチンの輸送活性を検出する。被検化合物非添加時での OCTN2 タンパク質の輸送活性と比較して、その活性を促進する化合物を選択する。具体的な方法については、特願平 9-260972 号および特願平 10-156660 号を参照のこと。

単離した化合物を疾患の治療薬として用いる場合には、上記 OCTN2 タンパク質を治療薬として用いる場合と同様に、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することができる。投与量は、通常、 $0.01\text{mg/kg} \sim 1000\text{mg/kg}$ の範囲内である。

全身性カルニチン欠乏症の治療には、これ以外にも、OCTN2 遺伝子の発現を制御する領域もしくはこれに結合する因子を利用する方法が考えられる。

OCTN2 遺伝子の発現を制御する領域を有する OCTN2 遺伝子は、例えば OCTN2 遺伝子の発現が欠失または欠損している患者に導入することにより、生体内における自然な発現制御下で、OCTN2 遺伝子を発現させることができるため上記の遺伝子治療において特に有用である。

また、OCTN2 遺伝子上流からプロモーター部位が特定されれば、この部位を持つリポーター遺伝子発現ベクターを用い、様々な化合物によるリポーター遺伝子産物の産生に及ぼす影響を調べることにより、簡便に OCTN2 遺伝子発現量を調節する化合物をスクリーニングすることが可能である。このようなスクリーニング方法としては、(a)プロモーター部位の下流にレポーター遺伝子が連結されたベクターを構築する工程、(b)該ベクターを適当な細胞に導入する工程、および(c)該細胞に被検化合物を接触または導入してレポーター遺伝子の活性を検出する工程、を含む方法が挙げられる。被検化合物としては、例えば、タンパク質、ペプチド、合成化合物、天然化合物、遺伝子、遺伝子産物などが挙げられる。

また、プロモーター部位に被検試料を接触させて、該プロモーター部位に結合する化合物(タンパク質など)を選択することにより、OCTN2 遺伝子の発現を制御する化合物をスクリーニングすることも可能である。例えば、プロモーター部位の塩基配列を持つ合成オリゴ DNA などを作製し、これをセファロースなどの適当な支持担体に結合させ、これに細胞抽出液などを接触させることにより、このプロモーター部位に結合し、OCTN2 遺伝子の発現を制御する転写調節因子等を、アフィニティー精製などにより精製することもできる。

図面の簡単な説明

図 1 は、RT-PCR によって増幅されたマウス OCTN2 遺伝子の直接シーケンシングの結果を示す。wt/wt は野生型ホモマウス、jvs/jvs は jvs ホモマウスをそれぞれ表す。jvs マウスの OCTN2 遺伝子には矢印で示した塩基に変異が見られ

る。

図 2 は、jvs マウスの OCTN2 遺伝子に見られた変異を PCR-RFLP 法(Cfr 13I 切断)により検出した結果を示す電気泳動写真である。三角で示した断片は正常遺伝子由来であり、矢印で示した断片は変異遺伝子より生じた断片である。

図 3 は、野生型マウス OCTN2 と変異型マウス OCTN2 のカルニチン輸送活性を測定した結果を示す。野生型 (Wild) にはナトリウム依存性のカルニチン輸送活性が見られるが、変異型(Jvs)の場合は全く活性が見られない。Mock は cDNA を含まないベクターを対照として用いた場合。

図 4 は、抗 myc 抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果を示す電気泳動写真である。野生型 OCTN2 タンパク質(Wild)と変異型 OCTN2 タンパク質(Jvs)は同程度産生されていることがわかる。Mock は cDNA を含まないベクターを対照として用いた場合。

図 5 は、家系 KR の OCTN2 遺伝子の解析結果を示す。上部にこの家系の家系図を示した。□は男性、○は女性をそれぞれ表す。黒いシンボルは全身性カルニチン欠乏症を発症していることを表す。下部は PCR の結果を示す電気泳動写真である。「N」は対照として用いた正常遺伝子の結果を表す。三角で示した断片は正常遺伝子由来の PCR 産物であり、矢印で示した断片は欠損が存在する遺伝子から由来した断片である。

図 6 は、OCTN2 遺伝子エキソン 1 のシークエンシング解析の結果を示す。正常 OCTN2 遺伝子 (上のパネル;Wild type) に対し、家系 AK に属する全身性カルニチン欠乏症患者の OCTN2 遺伝子 (下のパネル) には矢印で示した位置に 1 塩基のシトシンの挿入が見られる。

図 7 は、OCTN2 遺伝子エキソン 2 のシークエンシング解析の結果を示す。正常 OCTN2 遺伝子 (上のパネル;Wild type) に対し、家系 AK に属する全身性カルニチン欠乏症患者の OCTN2 遺伝子 (下のパネル) には矢印で示した位置に G から A の 1 塩基置換が見られる。

図8は、家系AKに属する全身性カルニチン欠乏症患者のOCTN2遺伝子に見られた2種類の変異をそれぞれBclIおよびNla IVを用いたPCR-RFLP法により解析した結果を示す電気泳動写真である。上部にこの家系の家系図を示す。「N」は対照として用いた正常遺伝子の結果を表す。矢印で示した断片は変異遺伝子に由来する断片である。

図9は、OCTN2遺伝子イントロン8/エキソン9領域のシーケンシング解析の結果を示す。正常遺伝子（正常）に対し、家系THに属する全身性カルニチン欠乏症患者由来の遺伝子（患者）にはイントロン8の3'側末端においてスプライシングサイトの変異(AG→AA)が存在することがわかる。上部にこの家系の家系図を示した。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例1】全身性カルニチン欠乏症(Systemic Carnitine Deficiency, SCD)の原因遺伝子がOCTN2であることの、マウスおよびヒトにおける証明

本発明者らは、カルニチンをナトリウムイオン依存的に輸送する活性を有するタンパク質をコードするヒトcDNAおよびこれに対応するマウスcDNAを単離している（特願平9-260972号、特願平10-156660号）。本発明者らにより単離されたヒトOCTN2 cDNAおよびマウスOCTN2 cDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：2および配列番号：4に、これらcDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1および配列番号：3に示す。

本発明者らは、OCTN2が全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子ではないかという作業仮説を立て、これを検証する実験を行った。

(1) jvs (juvenile visceral steatosis) マウスにおけるOCTN2遺伝子の解析

jvs (juvenile visceral steatosis) マウスは C3H.OH 系統マウスより突然変異により生じたマウスである。このマウスはヒト全身性カルニチン欠乏症患者と類似した症状を示し、その血中、組織中カルニチン濃度は著しく低いことが明らかにされている。またこの表現型は常染色体劣性遺伝形式により遺伝する。以上のことより jvs マウスはヒト全身性カルニチン欠乏症のモデルマウスであると考えられている (Hashimoto, N. et al. Gene-dose effect on carnitine transport activity in embryonic fibroblasts of JVS mice as a model of human carnitine transporter deficiency. *Biochem Pharmacol* 55, 1729-1732 (1998))。そこで、まず jvs マウスにおける OCTN2 遺伝子の配列を調べた。具体的には、jvs ホモマウスの腎臓より全 RNA を抽出し、cDNA を合成した後これを鋳型として RT-PCR により jvs マウス OCTN2 cDNA を増幅し、直接シーケンシングすることにより配列を調べた。

PCR による増幅の反応は、5' 側断片については MONB 31 プライマー (5'-gataagcttacggtgtcccccattattcccatac-3' / 配列番号 : 22) および MONB 20 プライマー (5'-cccatgccacaaggacaaaaagc-3' / 配列番号 : 23) を作製し、cDNA、10×KOD 緩衝液 (東洋紡社製) 5 μ l、2mM dNTPs 5 μ l、25mM MgCl₂ 2 μ l、KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡社製) 0.5 μ l、20 μ M MONB 31 プライマー 1 μ l、20 μ M MONB 20 プライマー 1 μ l を含む反応液 (50 μ l) 中で、94°C で 3 分、「94°C で 30 秒、50°C で 30 秒、74°C で 1 分」を 30 サイクル、72°C で 10 分の条件で行った。また、3' 側断片については、MONB 6 プライマー (5'-tggtttttcgtgggtgtgctgatgg-3' / 配列番号 : 24) および MONB 26 プライマー (5'-acagaacagaaaagccctcagtca-3' / 配列番号 : 25) を作製し、cDNA、10×ExTaq 緩衝液 (TaKaRa 社製) 5 μ l、2.5mM dNTPs 4 μ l、ExTaq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa 社製) および抗 Taq 抗体 (TaqStart antibody™, CLONTECH 社製) の混合物 1 μ l、20 μ M MONB 6 プライマー 1 μ l、20 μ M MONB 26 プライマー 1 μ l を含む反応液 (50 μ l) 中で、94°C で 2 分、「94°C で 30 秒、60°C で 30 秒、74°C で 2 分」を 30 サイクル、72°C で 10 分

の条件で行った。

シーケンシングの結果、352番目のロイシンをコードするコドン (CTG) がアルギニンをコードするコドン (CGG) に変異していることが判明した (図1)。この変異は Cfr13I 制限酵素サイトの獲得として PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法により検出することが可能である。この方法で調べたところ、jvs ホモマウス (jvs/jvs) はこの変異を両アレルに持っており、またヘテロマウス (wt/jvs) はこの変異が存在するアレルと野生型のアレルの両方を持つことが明らかとなった (図2左)。さらに、12回以上バッククロス (戻し交配) することにより、遺伝的背景を C57BL/6 に置き換えた jvs マウス (C57BL jvs) においてもこの変異が存在することが示された (図2右)。C57BL jvs マウスは jvs 表現型を指標にした選択を重ねられ作製されたマウスであることから、jvs 表現型とこの OCTN2 遺伝子変異の間には非常に緊密な関連があるといえる。

次に、この変異が活性にどのような影響を及ぼすのかを調べた。野生型マウス OCTN2 を発現するプラスミド DNA と、この変異 OCTN2 を発現するプラスミド DNA をそれぞれ HEK293 細胞に導入し、特願平 10-156660 号に記載のヒト OCTN2 の測定の場合と同様にカルニチン輸送能を測定した (図3)。その結果、野生型マウス OCTN2 はヒトの場合と同様にナトリウム依存性のカルニチン輸送活性を示すのに対し、変異を導入した OCTN2 は全く活性を示さないことが明らかとなった。両タンパク質が同程度の量発現していることは、C末端に付加した c-myc エピトープ配列 (NH₂ - EQKLISEEDL - COOH) に対する抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した (図4)。

以上の結果より、jvs マウスは OCTN2 遺伝子の機能欠失変異により発症しているものと考えられた。

(2) ヒト全身性カルニチン欠乏症患者における OCTN2 遺伝子の解析

ヒト OCTN2 cDNA の配列を用いたデータベースサーチより、ヒト OCTN2 ゲノム

DNA 配列はヒトゲノムプロジェクトの一環として米国 Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL)によって解読されていることを見いだした。しかしそれはいくつかのコスミドクローンの配列として登録されているにすぎなかったため、ヒト OCTN2 cDNA の配列と比較しつなぎ合わせていくことにより、完全なヒト OCTN2 ゲノム DNA 配列を決定した(配列番号: 5)。その結果、ヒト OCTN2 遺伝子は 10 個のエキソンと 9 個のイントロンからなる約 26kb の遺伝子であることが明らかとなった。この遺伝子配列から全てのエキソンを 8 つの断片として増幅できる以下の 8 組のプライマーを作製した。

即ち、エキソン 1 については、OCN2 43 (5'-GCAGGACCAAGGCGGCGGTGTCAG-3' / 配列番号: 6)および OCN2 44 (5'-AGACTAGAGGAAAAACGGGATAGC-3' / 配列番号: 7)、エキソン 2 については OCN2 25 (5'-AGATTTTATAGGAGCAAGCGTTAGA-3' / 配列番号: 8)および OCN2 26 (5'-GAGGCAGACACCGTGGCACTACTA-3' / 配列番号: 9)、エキソン 3 とエキソン 4 については OCN2 27 (5'-TTCACACCCACTTACTGGATGGAT-3' / 配列番号: 10)および OCN2 50 (5'-ATTCTGTTTTGTTTTGGCTCTTTT-3' / 配列番号: 11)、エキソン 5 については OCN2 31 (5'-AGCAGGGCCTGGGCTGACATAGAC-3' / 配列番号: 12)および OCN2 32 (5'-AAAGGACCTGACTCCAAGATGATA-3' / 配列番号: 13)、エキソン 6 については OCN2 33 (5'-TCTGACCACCTCTTCTTCCATAC-3' / 配列番号: 14)および OCN2 34 (5'-GCCTCCTCAGCCACTGTCGGTAAC-3' / 配列番号: 15)、エキソン 7 については OCN2 35 (5'-ATGTTGTTTCCTTTTGTTATCTTAT-3' / 配列番号: 16)および OCN2 36 (5'-CTTGTTTTCTTGTGTATCGTTATC-3' / 配列番号: 17)、エキソン 8 とエキソン 9 については OCN2 37 (5'-TATGTTTGTGTTTGTCTCTCAATAGC-3' / 配列番号: 18)および OCN2 40 (5'-TCTGTGAGAGGGAGTTTGCGAGTA-3' / 配列番号: 19)、エキソン 10 については OCN2 41 (5'-TACGACCGCTTCCCTGCCCTACATT-3' / 配列番号: 20)および OCN2 42 (5'-TCATTCTGCTCCATCTTCATTACC-3' / 配列番号: 21)を作製した。

3 組のお互いに血縁関係のない全身性カルニチン欠乏症患者を有する家系に

において、ヒト OCTN2 遺伝子の変異を調べた。これらのプライマーを用い、血液細胞より調製したゲノム DNA を鋳型に全エキソンを PCR により増幅し、それを直接シーケンシングすることにより解析を行った。

PCR による増幅の反応は、ゲノム DNA 100ng、10×ExTaq 緩衝液 (TaKaRa 社製) 5 μ l、2.5mM dNTPs 4 μ l、ExTaq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa 社製) および抗 Taq 抗体 (TaqStart antibody™, CLONTECH 社製) の混合物 1 μ l、20 μ M の各プライマー 1 μ l を含む反応液 (50 μ l) 中で、94°C で 2 分、「94°C で 30 秒、60°C で 30 秒、74°C で 2 分」を 36 サイクル、72°C で 10 分の条件で行った。ただし、エキソン 1 およびエキソン 5 を増幅する場合においては、ゲノム DNA 100ng、2×GC 緩衝液 1 (TaKaRa 社製) 25 μ l、2.5mM dNTPs 8 μ l、LA Taq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa 社製) 0.5 μ l、20 μ M の各プライマー 1 μ l を含む反応液 (50 μ l) を用いた。

最初の家系 (家系 KR) に属する全身性カルニチン欠乏症患者の OCTN2 遺伝子にはエキソン 1 に 113 bp の欠失が認められた (図 5)。この欠失は開始コドンを含んでおり、完全なタンパク質は産生されないものと考えられる。正しいフレームに存在する利用可能な次の ATG コドンは 177 番目であり、この場合少なくとも 2 つの膜貫通領域が欠失するものと考えられる。この家系に属する 2 人の全身性カルニチン欠乏症患者はこの変異 OCTN2 遺伝子を両アリルに持っていることがわかった。一方、発症していない患者の両親と、患者の 2 人の兄弟はいずれもこの変異遺伝子を片方のアリルに持つだけであった。

二番目の家系 2 (家系 AK) における全身性カルニチン欠乏症患者は 2 種類の変異 OCTN2 遺伝子を持つことが明らかとなった。一つは開始コドンのすぐ後に 1 塩基シトシンが挿入されたものであり、このためにフレームシフトが起き正しいタンパク質は全く産生されないと考えられる (図 6)。もう一つの変異は 132 番目のトリプトファンをコードするコドン (TGG) における 1 塩基置換 (G→A) であり、このためこのコドンはストップコドン (TGA) に変化していた (図 7)。

これらの変異によりこの患者は活性を持つ OCTN2 タンパク質を産生できないものと考えられる。これらの変異はそれぞれ BclI、Nla IV 制限酵素を用いた PCR-RFLP 解析により検出することが可能であり、その結果、患者の両親はそれぞれの変異を一つずつ持っており、また発症していない患者の兄弟はいずれの変異遺伝子も持っていないことが明らかとなった(図 8)。

三番目の家系(家系 TH)においては OCTN2 遺伝子のイントロン 8 の 3' 側末端におけるスプライシングサイトの変異 (AG→AA) を見いだした(図 9)。この変異により OCTN2 遺伝子は正常なスプライシングができなくなり正常なタンパク質が産生されなくなることが予想される。シーケンシング解析により、この家系に属する全身性カルニチン欠乏症患者はこの変異を両アリルに持っていることが明らかとなった。一方、患者の両親と、発症していない兄弟のうちの一は一つの変異アリルを持っていることが示された。

以上の結果より、全身性カルニチン欠乏症は OCTN2 遺伝子の変異により生じる遺伝病であることが明らかとなった。この解析に用いた方法はもちろん、それ以外の方法により OCTN2 遺伝子の変異を調べることによって、全身性カルニチン欠乏症の確定診断、出生前診断などを行うことが可能になったものと考えられる。また、全身性カルニチン欠乏症患者に対する OCTN2 遺伝子を用いた遺伝子治療等の方法による治療も可能であると考えられる。

産業上の利用の可能性

本発明により OCTN2 遺伝子が、全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子であることが解明され、これにより OCTN2 遺伝子やそのタンパク質の変異を検出することにより、全身性カルニチン欠乏症の検査を行うことが可能となった。また、本発明により、OCTN2 遺伝子やそのタンパク質を利用して全身性カルニチン欠乏症の治療を行うことが可能となった。

請求の範囲

1. 配列番号：5 に記載の塩基配列からなる DNA またはその転写制御領域にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有する、全身性カルニチン欠乏症の検査に用いるための DNA。
2. 全身性カルニチン欠乏症の治療に用いるための下記 (a) から (c) のいずれかに記載の分子。
 - (a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
 - (b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の活性を促進する化合物。
 - (c) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。
3. 請求項 2 に記載の分子を有効成分とする、全身性カルニチン欠乏症治療薬。
4. 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する抗体を有効成分とする、全身性カルニチン欠乏症検査薬。
5. 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA またはその転写制御領域における変異を検出することを特徴とする、全身性カルニチン欠乏症の検査方法。
6. 請求項 5 に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、
 - (a) 患者から DNA 試料を調製する工程、
 - (b) 請求項 1 に記載の DNA をプライマーとして用いて患者由来の DNA を増幅する工程、
 - (c) 増幅した DNA を切断する工程、
 - (d) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程、
 - (e) 分離した DNA 断片に対し、検出可能な標識をした請求項 1 に記載の DNA をプローブとしてハイブリダイズさせる工程、および

(f) 検出された DNA 断片の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

7. 請求項 5 に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、

(a) 患者から RNA 試料を調製する工程、

(b) 大きさに応じて調製した RNA を分離する工程、

(c) 分離した RNA に対し、検出可能な標識をした請求項 1 に記載の DNA をプローブとしてハイブリダイズさせる工程、および

(d) 検出された RNA の大きさを、健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

8. 請求項 5 に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、

(a) 患者から DNA 試料を調製する工程、

(b) 請求項 1 に記載の DNA をプライマーとして患者由来の DNA を増幅する工程、

(c) 増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる工程、

(d) 解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程、および

(e) 分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

9. 請求項 5 に記載の全身性カルニチン欠乏症の検査方法であって、

(a) 患者から DNA 試料を調製する工程、

(b) 請求項 1 に記載の DNA をプライマーとして患者由来の DNA を増幅する工程、

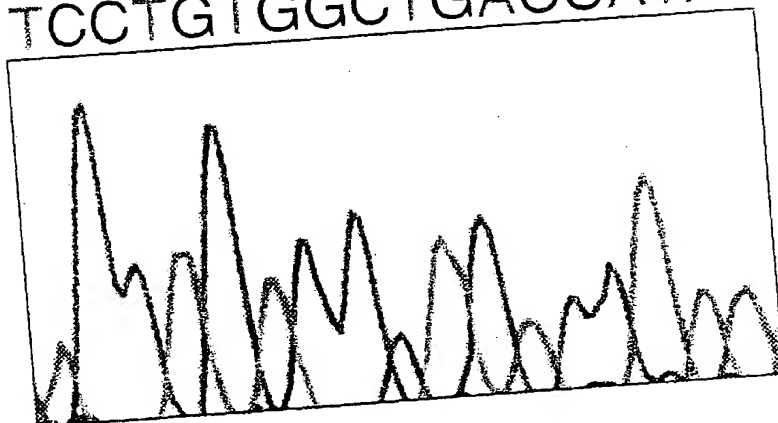
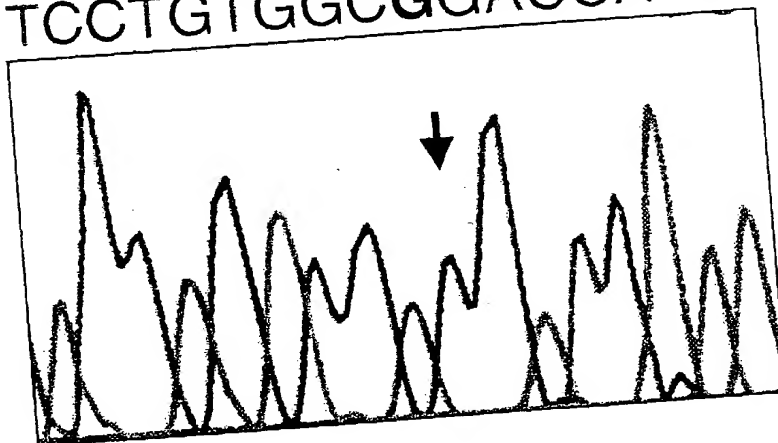
(c) 増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程、および

(d) 分離した DNA のゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

[X] 1

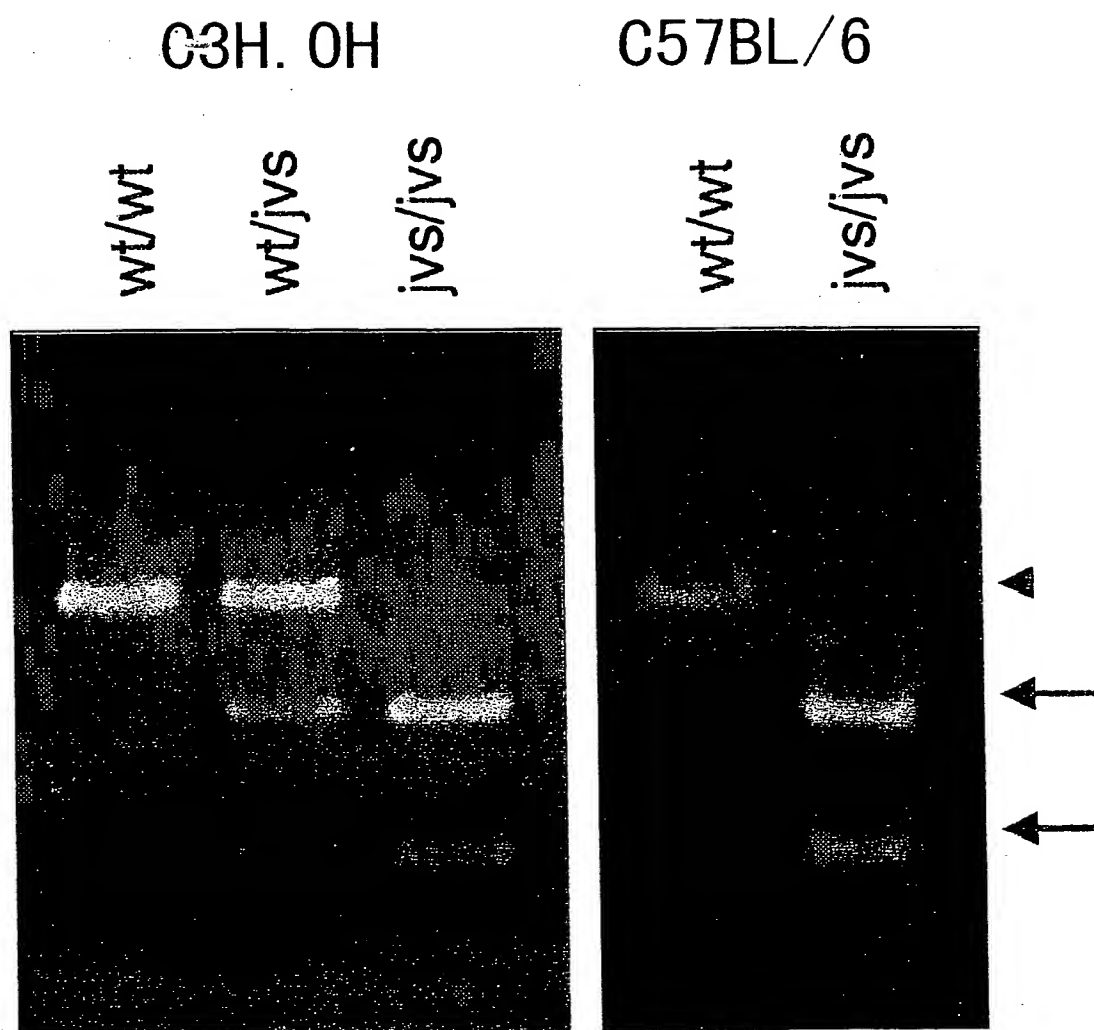
1105

TCCTGTGGCTGACCATA

wt/wtTCCTGTGGC**G**GACCATA*jvs/jvs*

2 / 9

☒ 2



3 / 9

図 3

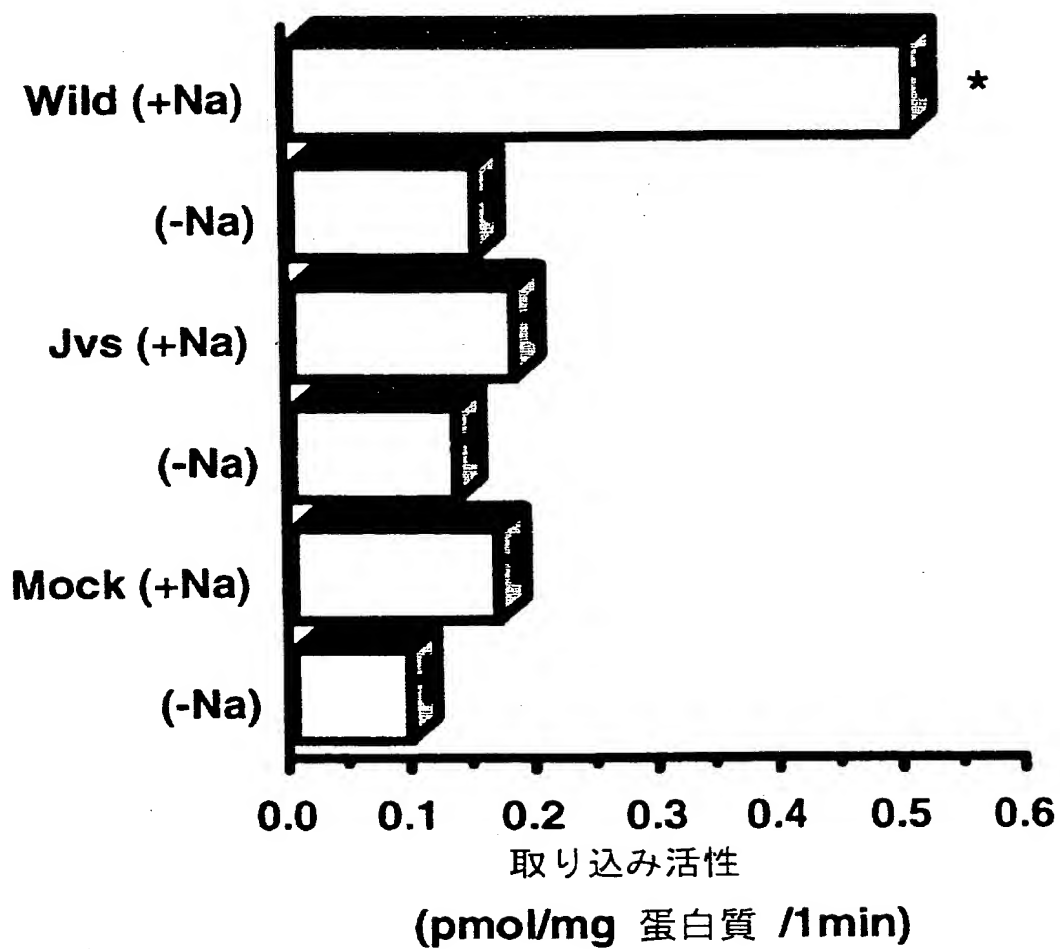
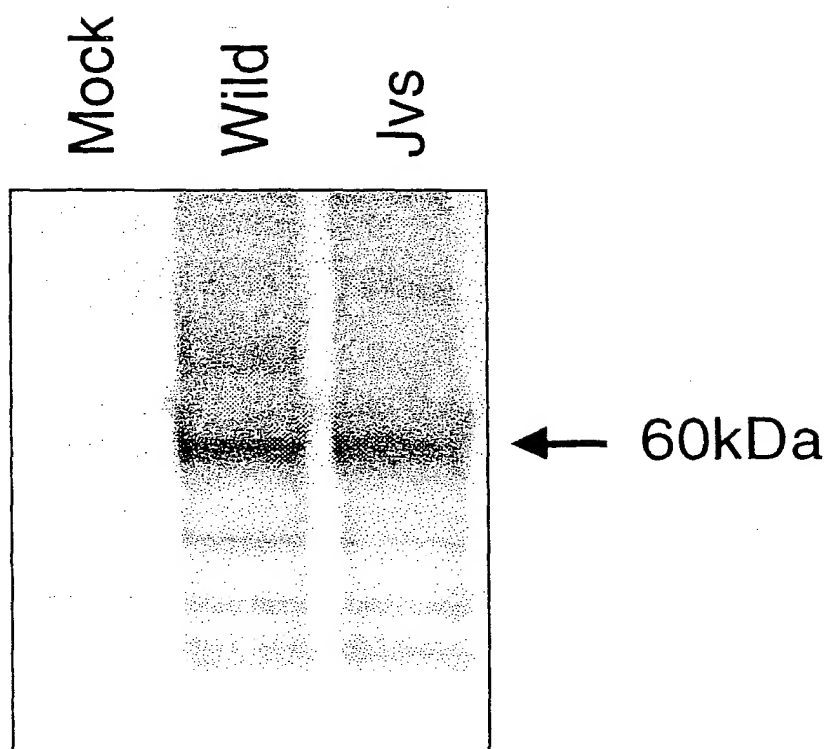
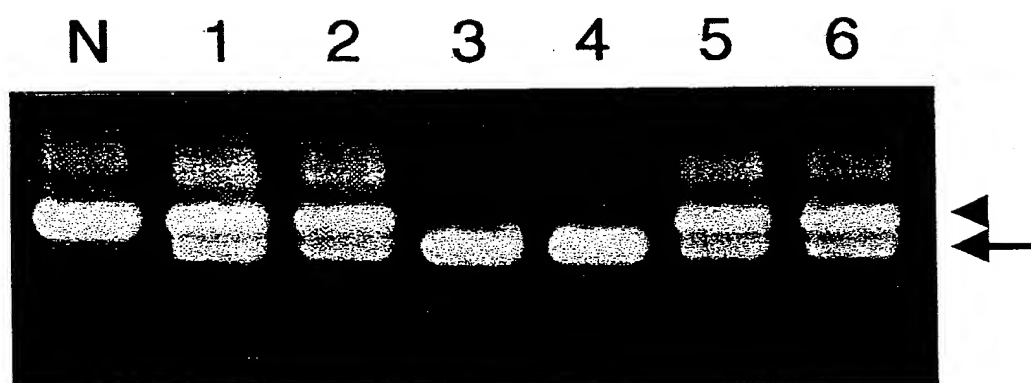
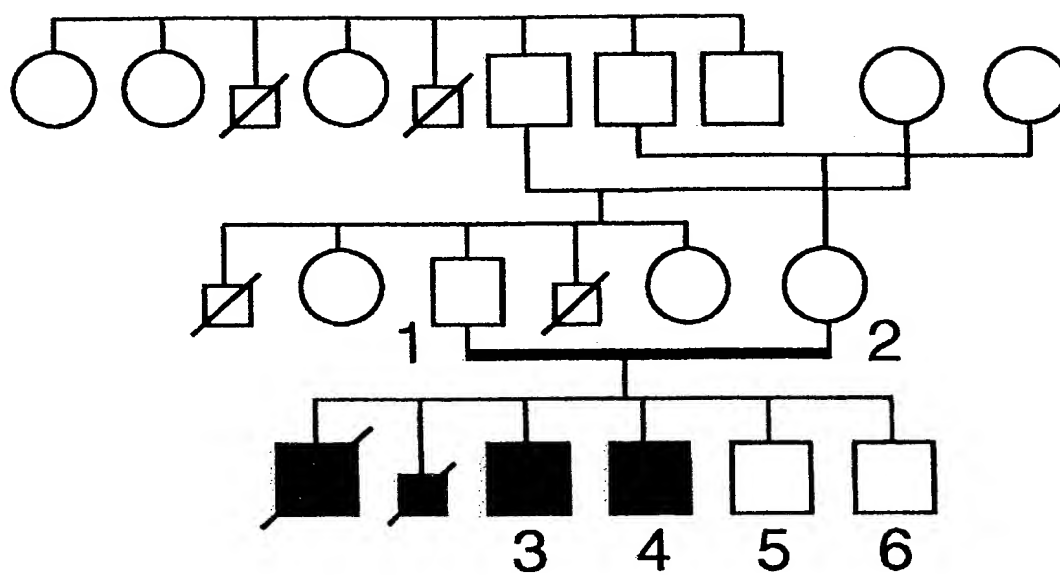


図 4



5 / 9

図 5

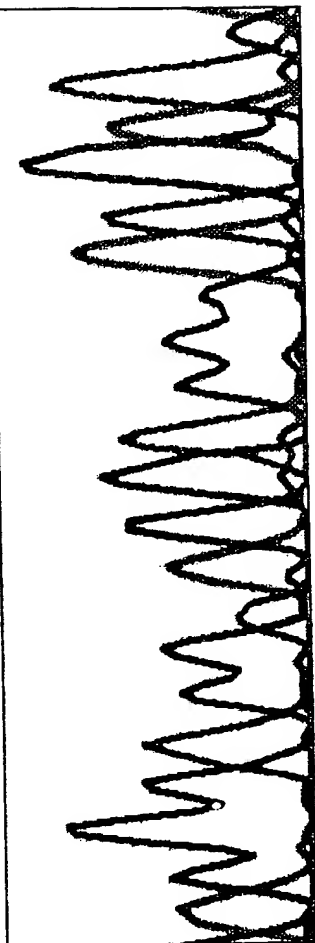


6 / 9

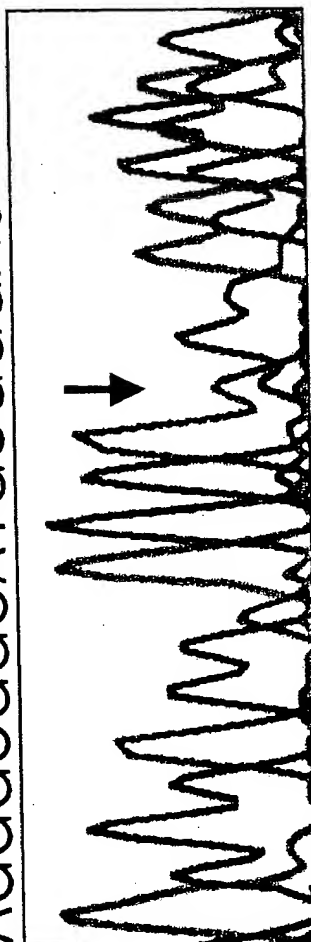
6

214

AGGGCGGCATGCGGGACTACG



Wild type

CGGGACTAC
AGGGCGGCATGCGGGACTACG

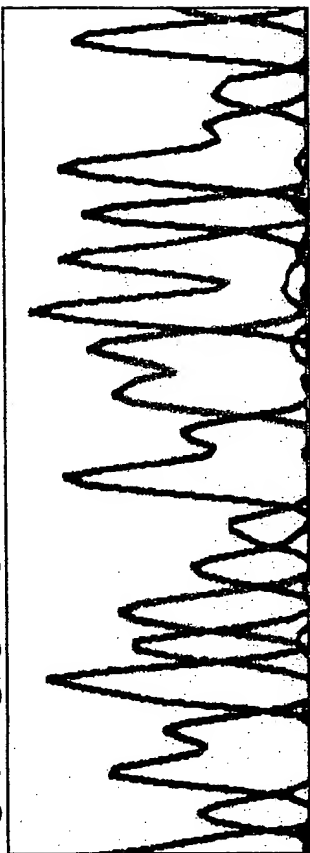
Ins C, nt226

7 / 9

図 7

8630

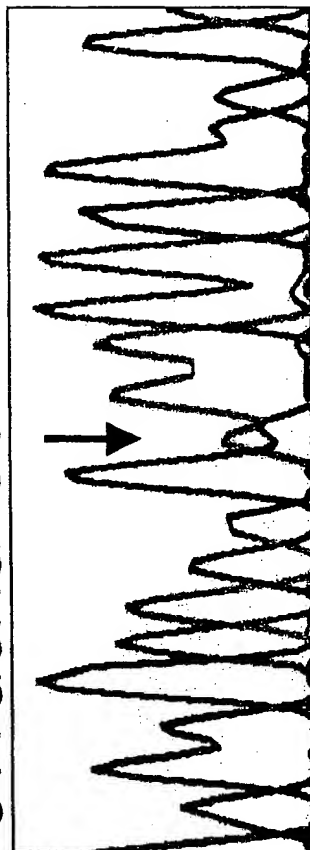
CTTGAGTGGAACTGGTG



Wild type

A

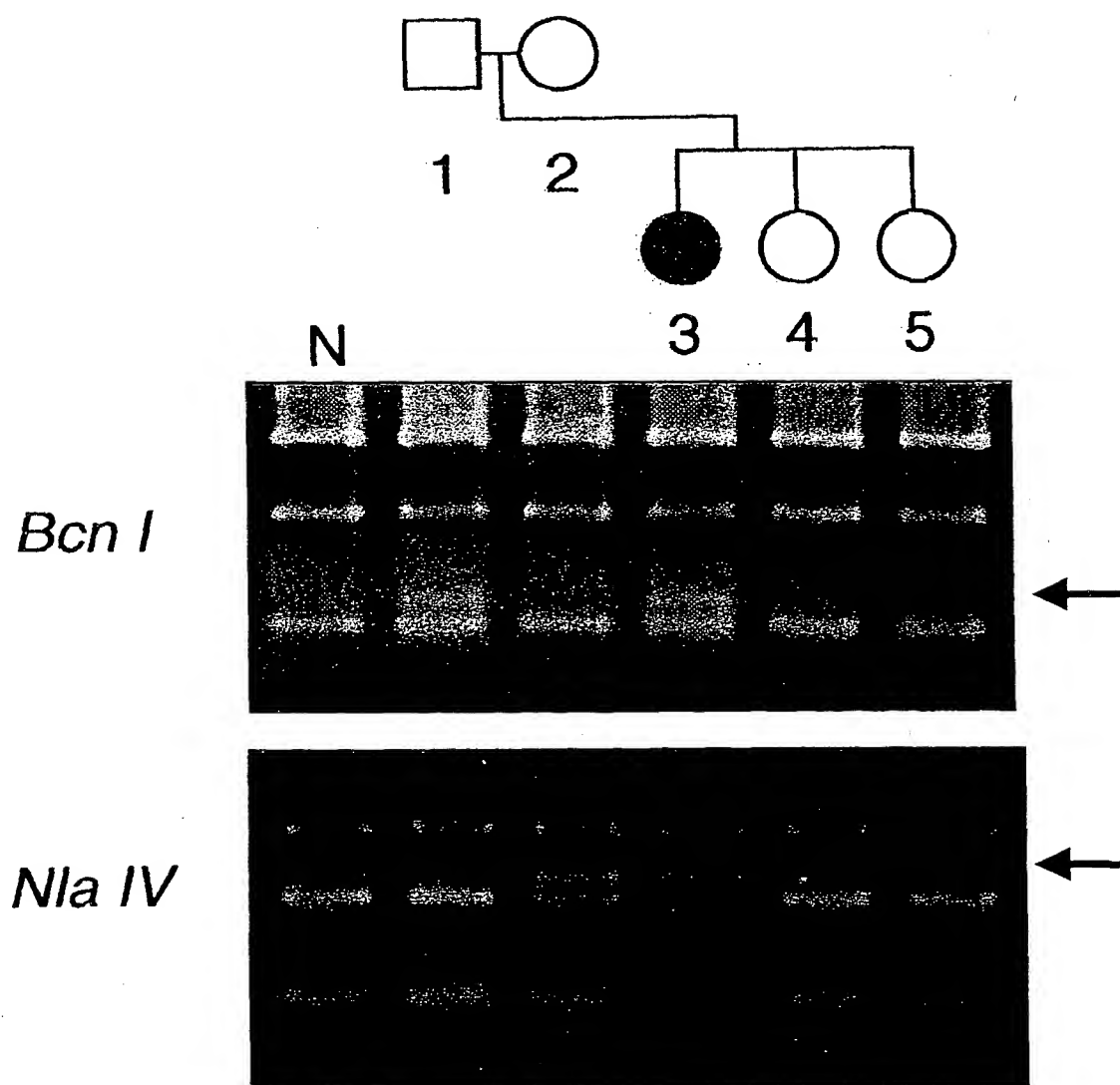
CTTGAGTGGAACTGGTG



nt8639 G - A

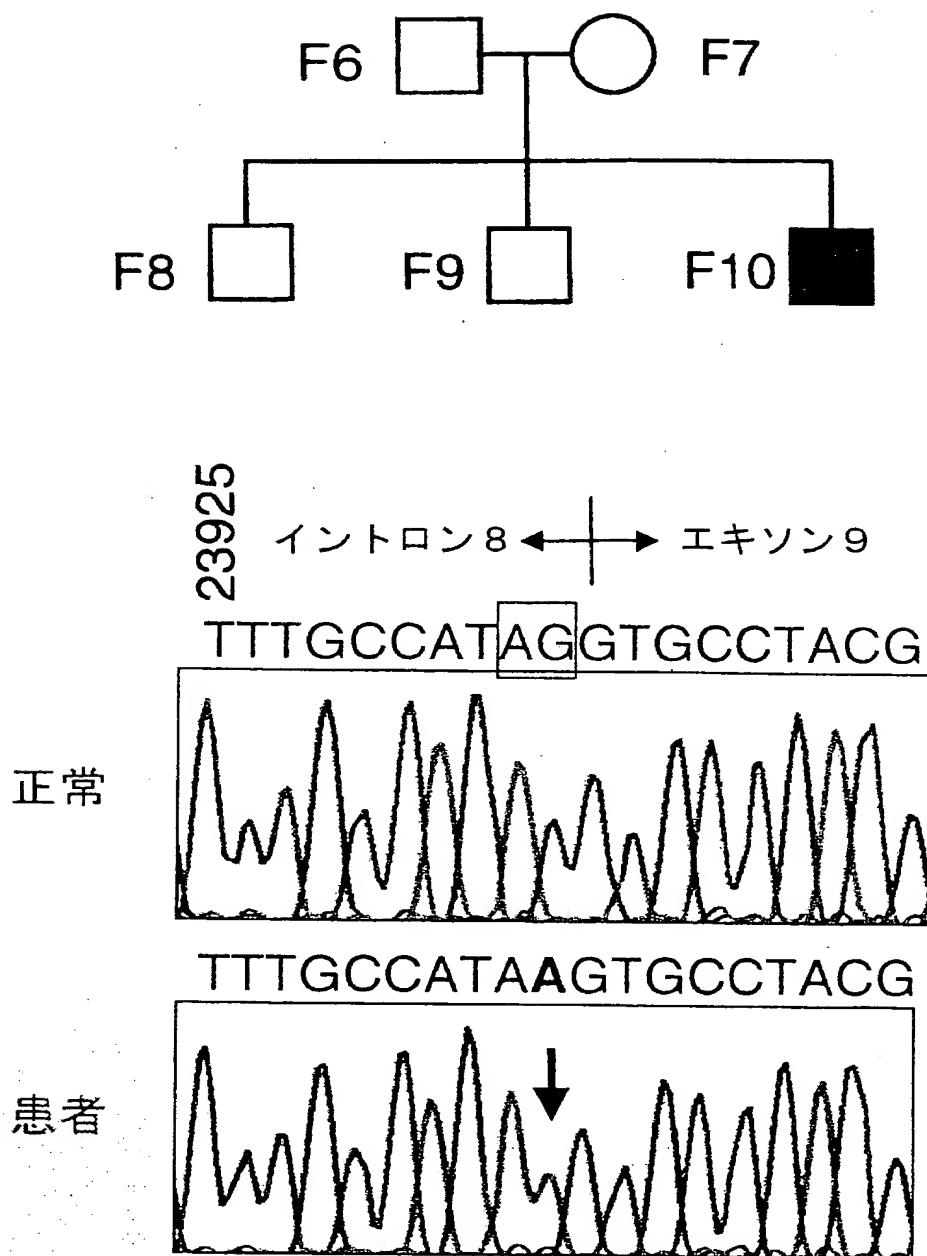
8 / 9

☒ 8



9 / 9

図 9



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

株式会社中外分子医学研究所

<120> SYSTEMIC CARNITINE DEFICIENCY GENE AND ITS USE

全身性カルニチン欠損症遺伝子およびその利用

<130> C2-007PCT

<150> JP 1998-252683

<151> 1998-09-07

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 557

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

2/68

1	5	10	15												
Phe	Gln	Arg	Leu	Ile	Phe	Phe	Leu	Leu	Ser	Ala	Ser	Ile	Ile	Pro	Asn
	20							25						30	
Gly	Phe	Thr	Gly	Leu	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Ile	Ala	Thr	Pro	Glu	His
	35							40						45	
Arg	Cys	Arg	Val	Pro	Asp	Ala	Ala	Asn	Leu	Ser	Ser	Ala	Trp	Arg	Asn
	50							55						60	
His	Thr	Val	Pro	Leu	Arg	Leu	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Val	Pro	His	Ser
	65					70					75			80	
Cys	Arg	Arg	Tyr	Arg	Leu	Ala	Thr	Ile	Ala	Asn	Phe	Ser	Ala	Leu	Gly
						85					90			95	
Leu	Glu	Pro	Gly	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Gly	Gln	Leu	Glu	Gln	Glu	Ser
			100								105			110	
Cys	Leu	Asp	Gly	Trp	Glu	Phe	Ser	Gln	Asp	Val	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ile
			115								120			125	
Val	Thr	Glu	Trp	Asn	Leu	Val	Cys	Glu	Asp	Asp	Trp	Lys	Ala	Pro	Leu
			130								135			140	

Thr Ile Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Phe Ile Ser
145 150 155 160

Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Val Thr
165 170 175

Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys Asn
180 185 190

Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile
195 200 205

Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys
210 215 220

Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala
225 230 235 240

Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp
245 250 255

Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val Ala
260 265 270

Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly
275 280 285

Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala Asn

290

295

300

Gly Ile Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp

305

310

315

320

Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu Arg

325

330

335

Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp Met

340

345

350

Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu

355

360

365

His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu Val

370

375

380

Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg

385

390

395

400

Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe

405

410

415

Met Gln Leu Val Pro Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu Val

5/68

420

425

430

Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr Val

435

440

445

Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly

450

455

460

Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe

465

470

475

480

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

485

490

495

Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu Ser

500

505

510

Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys

515

520

525

Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys Asp

530

535

540

Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe

545

550

555

<210> 2

<211> 1831

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (124)..(1794)

<400> 2

cggacggtct tgggtcgcct gctgcctggc ttgcctggc gccggcggt gccccgcgcg 60

cacgcgcaaa gccccgcgcg ttcccagacc ccaggccgcg ctctgtgggc ctctgagggc 120

ggc atg cgg gac tac gac gag gtg acc gcc ttc ctg ggc gag tgg ggg 168

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly

1 5 10 15

ccc ttc cag cgc ctc atc ttc ttc ctg ctc agc gcc agc atc atc ccc 216

Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro

20 25 30

aat ggc ttc acc ggc ctg tcc tcc gtg ttc ctg ata gcg acc ccg gag 264

Asn Gly Phe Thr Gly Leu Ser Ser Val Phe Leu Ile Ala Thr Pro Glu

35 40 45

cac cgc tgc cgg gtg ccg gac gcc gcg aac ctg agc agc gcc tgg cgc 312
His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg
50 55 60

aac cac act gtc cca ctg cgg ctg cgg gac ggc cgc gag gtg ccc cac 360
Asn His Thr Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp Gly Arg Glu Val Pro His
65 70 75

agc tgc cgc cgc tac cgg ctc gcc acc atc gcc aac ttc tcg gcg ctc 408
Ser Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Leu
80 85 90 95

ggg ctg gag ccg ggg cgc gac gtg gac ctg ggg cag ctg gag cag gag 456
Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Glu
100 105 110

agc tgt ctg gat ggc tgg gag ttc agt cag gac gtc tac ctg tcc acc 504
Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln Asp Val Tyr Leu Ser Thr
115 120 125

att gtg acc gag tgg aac ctg gtg tgt gag gac gac tgg aag gcc cca 552
Ile Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Ala Pro
130 135 140

ctc aca atc tcc ttg ttc ttc gtg ggt gtg ctg ttg ggc tcc ttc att 600

8/68

Leu Thr Ile Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Phe Ile
 145 150 155

tca ggg cag ctg tca gac agg ttt ggc cgg aag aat gtg ctg ttc gtg 648
 Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Val
 160 165 170 175

acc atg ggc atg cag aca ggc ttc agc ttc ctg cag atc ttc tcg aag 696
 Thr Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys
 180 185 190

aat ttt gag atg ttt gtc gtg ctg ttt gtc ctt gta ggc atg ggc cag 744
 Asn Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln
 195 200 205

atc tcc aac tat gtg gca gca ttt gtc ctg ggg aca gaa att ctt ggc 792
 Ile Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly
 210 215 220

aag tca gtt cgt ata ata ttc tct acg tta gga gtg tgc ata ttt tat 840
 Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr
 225 230 235

gca ttt ggc tac atg gtg ctg cca ctg ttt gct tac ttc atc cga gac 888
 Ala Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp
 240 245 250 255

tgg cgg atg ctg ctg gtg gcg ctg acg atg ccg ggg gtg ctg tgc gtg 936

Trp Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val

260

265

270

gca ctc tgg tgg ttc atc cct gag tcc ccc cga tgg ctc atc tct cag 984

Ala Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln

275

280

285

gga cga ttt gaa gag gca gag gtg atc atc cgc aag gct gcc aaa gcc 1032

Gly Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala

290

295

300

aat ggg att gtt gtg cct tcc act atc ttt gac ccg agt gag tta caa 1080

Asn Gly Ile Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln

305

310

315

gac cta agt tcc aag aag cag cag tcc cac aac att ctg gat ctg ctt 1128

Asp Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu

320

325

330

335

cga acc tgg aat atc cgg atg gtc acc atc atg tcc ata atg ctg tgg 1176

Arg Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp

340

345

350

atg acc ata tca gtg ggc tat ttt ggg ctt tcg ctt gat act cct aac 1224

10/68

Met Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn

355

360

365

ttg cat ggg gac atc ttt gtg aac tgc ttc ctt tca gcg atg gtt gaa 1272

Leu His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu

370

375

380

gtc cca gca tat gtg ttg gcc tgg ctg ctg ctg caa tat ttg ccc cgg 1320

Val Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg

385

390

395

cgc tat tcc atg gcc act gcc ctc ttc ctg ggt ggc agt gtc ctt ctc 1368

Arg Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu

400

405

410

415

ttc atg cag ctg gta ccc cca gac ttg tat tat ttg gct aca gtc ctg 1416

Phe Met Gln Leu Val Pro Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu

420

425

430

gtg atg gtg ggc aag ttt gga gtc acg gct gcc ttt tcc atg gtc tac 1464

Val Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr

435

440

445

gtg tac aca gcc gag ctg tat ccc aca gtg gtg aga aac atg ggt gtg 1512

Val Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val

450

455

460

11/68

gga gtc agc tcc aca gca tcc cgc ctg ggc agc atc ctg tct ccc tac 1560

Gly Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr

465

470

475

ttc gtt tac ctt ggt gcc tac gac cgc ttc ctg ccc tac att ctc atg 1608

Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met

480

485

490

495

gga agt ctg acc atc ctg aca gcc atc ctc acc ttg ttt ctc cca gag 1656

Gly Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu

500

505

510

agc ttc ggt acc cca ctc cca gac acc att gac cag atg cta aga gtc 1704

Ser Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val

515

520

525

aaa gga atg aaa cac aga aaa act cca agt cac aca agg atg tta aaa 1752

Lys Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys

530

535

540

gat ggt caa gaa agg ccc aca atc ctt aaa agc aca gcc ttc 1794

Asp Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe

545

550

555

taacatcgct tccagtaagg gagaaactga agaggaa

1831

12/68

<210> 3

<211> 557

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

1

5

10

15

Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn

20

25

30

Gly Phe Asn Gly Met Ser Ile Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His

35

40

45

Arg Cys Leu Val Pro His Thr Val Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn

50

55

60

His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Lys

65

70

75

80

Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Glu Leu Gly

85

90

95

Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser

100

105

110

Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Val Phe Leu Ser Thr Ile

115

120

125

Val Thr Glu Trp Asp Leu Val Cys Lys Asp Asp Trp Lys Ala Pro Leu

130

135

140

Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Met Gly Ser Phe Ile Ser

145

150

155

160

Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Leu Thr

165

170

175

Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Val Phe Ser Val Asn

180

185

190

Phe Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile

195

200

205

Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys

210

215

220

Ser Ile Arg Ile Ile Phe Ala Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala

225

230

235

240

14/68

Phe Gly Phe Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp

245

250

255

Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val Pro Gly Val Leu Cys Gly Ala

260

265

270

Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly

275

280

285

Arg Ile Lys Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ile Asn

290

295

300

Gly Ile Val Ala Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp

305

310

315

320

Leu Asn Ser Thr Lys Pro Gln Leu His His Ile Tyr Asp Leu Ile Arg

325

330

335

Thr Arg Asn Ile Arg Val Ile Thr Ile Met Ser Ile Ile Leu Trp Leu

340

345

350

Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu

355

360

365

His Gly Asp Ile Tyr Val Asn Cys Phe Leu Leu Ala Ala Val Glu Val

15/68

370	375	380
Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg		
385	390	395 400
Tyr Ser Ile Ser Ala Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe		
	405	410 415
Met Gln Leu Val Pro Ser Glu Leu Phe Tyr Leu Ser Thr Ala Leu Val		
	420	425 430
Met Val Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Ser Met Val Tyr Val		
	435	440 445
Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly		
	450	455 460
Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe		
	465	470 475 480
Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly		
	485	490 495
Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Phe Pro Glu Ser		
	500	505 510

16/68

Phe Gly Val Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys

515

520

525

Gly Ile Lys Gln Trp Gln Ile Gln Ser Gln Thr Arg Met Gln Lys Asp

530

535

540

Gly Glu Glu Ser Pro Thr Val Leu Lys Ser Thr Ala Phe

545

550

555

<210> 4

<211> 1888

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (60)..(1730)

<400> 4

ctcccgcgcc acggtgtccc cttattccca tacgggcgct gtgggaggct gaggacggc 59

atg cgg gac tac gac gag gtg acc gcc ttc cta ggc gag tgg ggg ccc 107

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro

1

5

10

15

17/68

ttc cag cgc ctc atc ttc ttc ctg ctc agc gcc agc atc atc ccc aat 155

Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn

20

25

30

ggc ttc aat ggt atg tcc atc gtg ttc ctg gcg ggg acc ccg gag cac 203

Gly Phe Asn Gly Met Ser Ile Val Phe Leu Ala Gly Thr Pro Glu His

35

40

45

cgt tgc ctt gtg cct cac acc gtg aac ctg agc agc gcg tgg cgc aac 251

Arg Cys Leu Val Pro His Thr Val Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn

50

55

60

cac agt atc ccg ttg gag acg aag gac gga cga cag gtg cct cag aaa 299

His Ser Ile Pro Leu Glu Thr Lys Asp Gly Arg Gln Val Pro Gln Lys

65

70

75

80

tgc cgc cgc tac cga ctg gcc acc atc gcc aac ttc tct gag cta ggg 347

Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Glu Leu Gly

85

90

95

ctg gag ccg ggg cgg gac gtg gac ctg gag cag ctg gag cag gag agc 395

Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Glu Gln Leu Glu Gln Glu Ser

100

105

110

tgc ctg gat ggc tgg gag tac gac aag gac gtc ttc ctg tcc acc atc 443

Cys Leu Asp Gly Trp Glu Tyr Asp Lys Asp Val Phe Leu Ser Thr Ile

18/68

115	120	125	
gtg aca gag tgg gac ctg gtg tgt aag gat gac tgg aaa gcc cca ctc 491			
Val Thr Glu Trp Asp Leu Val Cys Lys Asp Asp Trp Lys Ala Pro Leu			
130	135	140	
acc acc tcc ttg ttt ttc gtg ggt gtg ctg atg ggc tcc ttc att tca 539			
Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Met Gly Ser Phe Ile Ser			
145	150	155	160
gga cag ctc tca gac agg ttt ggt cgc aag aat gtg ctg ttt ttg acc 587			
Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Leu Thr			
	165	170	175
atg ggc atg cag act ggc ttc agc ttc ctg cag gtc ttc tct gtg aac 635			
Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Val Phe Ser Val Asn			
	180	185	190
ttc gag atg ttt aca gtg ctt ttt gtc ctt gtt ggc atg ggt cag atc 683			
Phe Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile			
195	200	205	
tcc aac tac gtg gca gca ttt gtc ctg gga aca gaa att ctt tcc aag 731			
Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Ser Lys			
210	215	220	

19/68

tca att cga att ata ttc gcc acc tta gga gtt tgc ata ttt tat gcg 779

Ser Ile Arg Ile Ile Phe Ala Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala

225

230

235

240

ttt ggc ttc atg gtg ctg cca ctg ttt gca tac ttc atc aga gac tgg 827

Phe Gly Phe Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp

245

250

255

agg atg ctg ctg ctg gcg ctc act gtg cca ggg gtg cta tgt ggg gct 875

Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val Pro Gly Val Leu Cys Gly Ala

260

265

270

ctc tgg tgg ttc atc cct gag tcc cca cga tgg ctc atc tct caa gcg 923

Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly

275

280

285

cga att aaa gag gca gag gtg atc atc cgc aaa gct gcc aaa atc aat 971

Arg Ile Lys Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ile Asn

290

295

300

ggg att gtt gca cct tcc act atc ttc gat cca agt gag tta caa gac 1019

Gly Ile Val Ala Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp

305

310

315

320

tta aat tct acg aag cct cag ttg cac cac att tat gat ctg atc cga 1067

Leu Asn Ser Thr Lys Pro Gln Leu His His Ile Tyr Asp Leu Ile Arg

20/68

	325	330	335	
aca cgg aat atc agg gtc atc acc atc atg tct ata atc ctg tgg ctg				1115
Thr Arg Asn Ile Arg Val Ile Thr Ile Met Ser Ile Ile Leu Trp Leu				
	340	345	350	
acc ata tca gtg ggc tat ttt gga cta tct ctt gac act cct aac ttg				1163
Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu				
	355	360	365	
cat ggg gac atc tat gtg aac tgc ttc cta ctg gcg gct gtt gaa gtc				1211
His Gly Asp Ile Tyr Val Asn Cys Phe Leu Leu Ala Ala Val Glu Val				
	370	375	380	
cca gcc tat gtg ctg gcc tgg ctg ttg ttg cag tac ttg ccc cgg cga				1259
Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg				
385	390	395	400	
tat tct atc tcg gct gcc ctt ttc ctg ggt ggc agt gtc ctt ctc ttc				1307
Tyr Ser Ile Ser Ala Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe				
	405	410	415	
atg cag ctg gtg cct tca gaa ttg ttt tac ttg tcc act gcc ctg gtg				1355
Met Gln Leu Val Pro Ser Glu Leu Phe Tyr Leu Ser Thr Ala Leu Val				
	420	425	430	

21/68

atg gtg ggg aag ttt gga atc acc tct gcc tac tcc atg gtc tat gtg 1403

Met Val Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Ser Met Val Tyr Val

435

440

445

tac aca gct gag ctg tac ccc act gtg gtc aga aac atg ggt gtg ggg 1451

Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly

450

455

460

gtc agc tcc aca gca tcc cgc ctt ggc agc atc ctg tct ccc tac ttt 1499

Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe

465

470

475

480

gtt tac cta ggt gcc tat gat cgc ttc ctg cct tat att ctc atg gga 1547

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly

485

490

495

agt ctg acc atc ctg aca gct atc ctc acc ttg ttc ttc cct gag agc 1595

Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Phe Pro Glu Ser

500

505

510

ttt ggt gtc cct ctc cca gat acc att gac cag atg cta agg gtc aaa 1643

Phe Gly Val Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys

515

520

525

gga ata aaa cag tgg caa atc caa agc cag aca aga atg caa aaa gat 1691

Gly Ile Lys Gln Trp Gln Ile Gln Ser Gln Thr Arg Met Gln Lys Asp

22/68

530 535 540

ggt gaa gaa agc cca aca gtc cta aag agc aca gcc ttc taacaccctg 1740
Gly Glu Glu Ser Pro Thr Val Leu Lys Ser Thr Ala Phe

545 550 555

tccagaaggc aaaaaactga ttggaaacct tcatgttgctc agaaatgctc tccatgactg 1800

agggttttctc tgttctgtta acctgtgtgc taacatgctc atggattggg gcatctgtcc 1860

tggagagtca ccttcctcta gggacacc 1888

<210> 5

<211> 25871

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<221> exon

<222> (1)..(614)

<220>

<221> intron

<222> (615)..(8636)

<220>

23/68

<221> exon

<222> (8637)..(8740)

<220>

<221> intron

<222> (8741)..(14409)

<220>

<221> exon

<222> (14410)..(14564)

<220>

<221> intron

<222> (14565)..(15590)

<220>

<221> exon

<222> (15591)..(15762)

<220>

<221> intron

<222> (15763)..(17282)

<220>

<221> exon

<222> (17283)..(17409)

<220>

<221> intron

<222> (17410)..(19178)

<220>

<221> exon

<222> (19179)..(19279)

<220>

<221> intron

<222> (19280)..(20947)

<220>

<221> exon

<222> (20948)..(21162)

<220>

<221> intron

<222> (21163)..(22690)

<220>

<221> exon

<222> (22691)..(22873)

<220>

25/68

<221> intron

<222> (22874)..(23934)

<220>

<221> exon

<222> (23935)..(24070)

<220>

<221> intron

<222> (24071)..(24443)

<220>

<221> exon

<222> (24444)..(25871)

<400> 5

gcggcccagg cccggaacct tccctggctg tgcgccatat gtaaggccag ccgcggcagg 60

accaaggcgg cgggtgtcagc tcgcgagcct accctccgcg gacggtcttg ggtgcctgc 120

tgcttggtt gcctggctgg cggcgggtgc cccgcgcgca cgcgcaaagc ccgccgcgtt 180

cccagacccc aggccgcgt ctgtgggcct ctgagggcgg catgcgggac tacgacgagg 240

tgaccgcctt cctgggcgag tgggggcct tccagcgcct catcttcttc ctgtcagcg 300

ccagcatcat ccccaatggc ttcaccggcc tgcctccgt gttcctgata gcgaccccg 360
agcaccgctg cggggtgccg gacgccgca acctgagcag cgcttgccg aaccacactg 420
tcccactgcg gctgcgggac ggccgcgagg tgccccacag ctgccgccg taccggctcg 480
ccaccategc caacttctcg gcgctcgggc tggagccggg gcgcgacgtg gacctggggc 540
agctggagca ggagagctgt ctggatggct gggagttcag tcaggacgtc tacctgtcca 600
ccattgtgac cgaggtgggt gccggccct gctggggctg agaccagggc tcggaggacc 660
tgtecggtc cttgaacctg agtcctctc tcccagatgc gcaactggacg ctgtcactcc 720
ccctccccc aCGgtcaaca ccctagcgt ggagaccctc cagccagggt gcttggaac 780
gcttcacgag gtgacctcca gccacagtgt gctcctccct gcacagggtg tcagtctggc 840
ctcccgtcct gatggccact ttgaagaggg taccaggaag gtccctggcg tccctggcg 900
atgctctatg gccctgtgtg tccaggactt actctagttg gggttgggg tggttaagtag 960
cagagccagg acttgggcca ggggtatcc cgttttccct ctagtctctt gatttctttt 1020
tagaagagaa gaaatacttc tcttctctga acttttaaaa gttaaataaa gcatgtgtat 1080

acaactgcct ctccctttt tctctagtt actccttccc ctaccgtcca caacccaaaa 1140

acgacaatct ggtcatgccc tgtaagtaat tgtttgcctt ttcccatggt cagttgtcag 1200

tctttttttt tttttttttt ttttgagaca gagtctccct ctgtcaccag gctggagcgc 1260

agtcgtgtgt tcttggtcca ctgcaacctt cgcagtcgtg cgttcttggt tcaactgcaat 1320

cttcgccttc cgggctcaag tgattctcct gcctcagcct ccgagtagct gtgagccacg 1380

acgccagct aatttttgtg ttttagtag agacgggggt tcaccgtgtt ggccaggatg 1440

gtctcgatct ctgacctcg tgatctgcct gcttctgcct gcaaagctgg gattacaacc 1500

gtgagccacc acgccaggcc gtcagttgtc actctttaag atccattcat ctgaagatgg 1560

gttcagggtg acttggtgac ctggaatatt ttctcaggta ttatgaggca aggctgtcgg 1620

ccagatttag ttaaagcata cagccttagg tcatagggtg tgggggagcc tttctcattt 1680

ctcatccct tggattttcc ctctgggtgg ttttgtctgt cccctccgaa cctgttgag 1740

cagttgttg agctggatgt aggaacatga tgtaaatgat gtatgtgttt tgtgtctttt 1800

ttagacactg gcactctagc tccctgaagt ttcagcagca ttgagtaagt agccagtgag 1860

tagccctcat tgatagatag gctcactaaa tgtgcagatg accaattcgc aggttagaga 1920

aggcttccca gaagaggagg cctctcagtg agcctagggt gttcagctca gcataatagt 1980

gagctgaagg ccccaatgca gcagcaagaa accaccacgc aggacggcgg agttcacaga 2040

gaggggagag ttcatagaga gggagagtgc cacaggccct ggcacagctt caagccctgc 2100

tggatgttgg tgctgagcct cccctcctgg agcctcagag gggcttacag gggctctgga 2160

gatcccaact gtgttgcttc ttggcgctcat cacccttcaa tggagtctga gagctaccct 2220

gggagatcca agtgtgtgtg catgtgtgtg ttttttcttt ttggaaattt gatgtcccca 2280

gcatttggac ctgctttctc cacatatatg tagtgggagt gtgaccggag cccactggg 2340

atttcttagc tagtgacata gcttcagtgt ccagaggcat catggcttga caaaagaggc 2400

actccttga ggtageccaac tgtgctttct ggcccatgaa tccacaggaa attggaactt 2460

tcagttgcca caaatcctgg gtcctagcct cacaggtggg tgtgttacct tcccgaagc 2520

cagtgagtac tatgaaagca gaggtgtcc ctgaggttgc aggcagaggc cacagagggg 2580

aacatgacac aggaatccct acaaattcta cttggggctg cctaaagaag agggaagtag 2640

tgaagcaaga agaagcacat ggcatctctt ggagttttac attgaccctt gagggttccc 2700
cggttactc tagtcacttg ttcctgcttt gctgcctcca tcccacattg ggctgagiga 2760
tggtggcatt gatgagctcc caaaggccag ctgtgccagg gggcttgacc ttatcttgct 2820
gccaatgtca gccttttggt ttttaatat tagactattt atttagctgt cttagcagtt 2880
tcaaaggagt tatgtgcctt ttcacctact tatatgttgt cagtctttgc agggaggcca 2940
gattaatgct tagatctttg ttttgggcta ctggaatgct tgacttgaag ttcagagctg 3000
cttgttccca ggtgaacagc tactgctgga agttgctgca tcaacattct aatggctttt 3060
tctatggcct gttgtctttc aacccaaacc tggcctgctg aacactgcat ctagtcccat 3120
gcctgctaaa tgtctctaag cctgcctctt gcccctaatc atacataaag gtgtttgtaa 3180
gtacactggt attgaattac tagtcatatt ttttccactg aagactggaa cctcaggtgt 3240
cctgtttgga tttttttaat ttgttcaagt taaagtacat acatgtagta ccaaactttg 3300
tggtggattt agatctttgc gtcttctca atttctgaca caattctgga tgcagaggga 3360
ggttctcagg aaaattttta ttgaatgagt taatgaataa ttttaagaaat catctctaaa 3420

gtttgagaac taaagaaaaa tagttcagtt cttagaaggg aaacttgagg gtggctgaaa 3480

aggattgact ggaatttttt aaaggaaatg tgactcccc tgccactga ctggggcttt 3540

gatgccacat ggatgtggaa tgaggtgttg ggattggcag agggaatctg ctagcaatta 3600

ataaataaat aaatattggc agggcgtggt ggctcacgcc tgtaatccca gcactttggg 3660

aagccaaggc agcaggtcac ttgaggtcgg gagttcaaga ccagtctggc caacatggtg 3720

aaactccatc tctactaaaa atacaaaaat tagctgggtg tgggtggcaca tgcctgtatt 3780

cccagctact tgggagactg aagcaggaga atcgcttgaa cccaggagc gggctttgca 3840

gtgaaccgag atcgagcctc tgcactctag cctgggcgac aaagcgagac tccatctcaa 3900

aagaataata ataatttaa taaataaaaa tgatttatga ggtaaaagag ttttatgccc 3960

ccatgttcca ggaatagttt ggtggtccac atggttctcg gctggcctct cctctgccc 4020

ctcagtcate cctggggtac tggggaatta gccaacccat catgcagtgc ttcttgcca 4080

tggactgecc catctgctgg aaacctgggt tgtttctgag gttgtctggg ctgtccgctc 4140

tttggtttca ccatagctct gtccagccta tggacagaca ggttccttga gaaacttccg 4200

gctgggtgtg gtggtcatg cctgtaaacc cagcactttg ggaggctgag gcaggtggat 4260

cacaaggcag gagttcgaga ccagcctggc caacatgggtg aaacctcgtc tccgctaaaa 4320

atacaaaaat tagccctgcg tggtagcggtg tgctgtaat cccagctact cgggaggag 4380

gctgaggcag gagaatttct tgaacctggg aagtgggggt tgcagtagcc aagatcgac 4440

cattgcatgc cagcctgggt gacaagagca agactccgct tcaaaaaaaaa aaaaagaaa 4500

agaaaagaaa ctccaagct gctctgcatc gccttgcctt ccacctgtct gcttctaaga 4560

agccctcggc ccagtcctgg gtgggactcc cactccctcc ccattgtcct ggactagctt 4620

ttctatcagc ctatcttgt gtagagacag atagtcttag aagatgagag agccctcact 4680

gttatcccca aagctgcctg gaggaagc cagagcaacc tgggagctgg gaccggggt 4740

gactctgggc agcagagacc cgagagacct ggaactgaa cctcactgtt acgctttgt 4800

tgatttctct cactcagggg acacacagac cctcatccag ctttttcag ctatatggca 4860

aggcagagaa gccacttgcg gggctccgtg gccactatg caggtacata gtagacacat 4920

ctggccatga gtggtcagat tgagccactc tctagctagc tgacacctgt catcctgggt 4980

caaatttctg acagttgaca caaagcaggg ggtcagggag ccaaaaaaaaa aaatggccag 5040

gtgtggtggc tcttgccctgt aatcccaggg ctttgggagg ccaaggtggg cagataacct 5100

gaggtcagag ttcaagacca gcttgggtcaa catggcaaaa ccccgctctct actaaaaata 5160

caaaaattag ccaggctggg ggtgcatccc tgtagtccca gccactcagg aggctgagge 5220

atgagaatca cttgaacccg ggaggtggag gttgcagtga gccgagattg tgccactgca 5280

ctccagcctg ggagacagag caagactctg tttcaaaaga aaaaaaagag tattctggag 5340

attgaagttc aggagttcag ggttcatctc gactttgggc agccaagcaa gaactaaagt 5400

ataccaagat gttgaagggt gataaccttt tatttatcga ttcattcact cacctatgta 5460

ccaaagagct cctgagcctc tcttcgatac agggggcact gccaggagtt gtagaggatg 5520

tgatagcaaa gataggaaat accttttctc tttgctctga caacggtggg gcaaggattc 5580

atcattgatt tcagcaggag gcaggataaa atgtgtgtag gaatatagga atacatggca 5640

atcagtaaca tgtggtacct agcagcatgt ctgactgttg atacggtcag gctaggtaca 5700

tcccctcagg gaagaacttc tgtcttaggg gcacacaccc tatctttttt ccttctctgc 5760

caattcacag gtaagaacat ttagtcccag ggaactatgt catctctcta cttctcataa 5820

ctgaaaaagc agtgccaatt atgtatgagg tataggagac acaattctcc ctctttttaa 5880

aaatgtttaa tagctttatt aaggtgtaaa tgacataaaa actgcatgta gctaaagcat 5940

gcaatttggc acacatgtat ctctacaccc ttgaaacat caccactaga aaggtgcatt 6000

tctccccagg aagaggggca agtctaggcc ctttgccaga gttgctccca gattgttttc 6060

aggttgggcc tgcattcaca gctcagccag ctgaagggtg acagcattag actcgtgacc 6120

caaatcttaa acccacacat tccattttta cattgatacc tgtgatcacc agccagtata 6180

gcccaccca tgtgccaggc ggaggcatca ataagctggt ctgtagcagc tttaatcaca 6240

gctggggagc caggagctaa ggaatgctag actcctttgt aaacaattta agtagggggt 6300

acttagcctg gactctatgt gcttctcacc cacctcttct caggagatt ctggccaagt 6360

cctggaacct actgcagtc atctggtggt tgacagatat gtggacggat tggcaggctg 6420

ggaccaatc tatgtttgcc cttgtgttca gttttgagac ctagcacctt tctgaccc 6480

gctcacagac cccctgcggc caataggaaa gaagtgttaa tgcatatttg cttttggagg 6540

gccccaaagcc aggccccagag agttgtcaag ggcggtcagt ggtgggtgga tggcagagtt 6600

aaccaaggag ttacacacct gcctagacta aggacaggct ggaccaagta gagagggtgg 6660

ggctaaggga gcctgagaga tgctctgggg cctgtctcaa aatgagcact atagtcaccc 6720

tgccccctgc agagattgtc tgacctggtt ttaggtcaca cccaaccttg ccagccaagg 6780

agtctttaga agcctgatat tgggagacct gtcctggggc ctacaacccc agaactcact 6840

gcagaagccc acgtggattg ctagtctagc tcagccatat gggcccccaa cctcacctc 6900

atgatatgcc tgtgagaaac cgctgctgac cttttgttca tgttttcacc tttccacta 6960

taaaagacat gctagctggg aaatagagcc catcatactc aagagtggca ggagccagg 7020

cctggccccct gaagcttggc ctcacacaca gaggccggca cctgtcacc aattccctca 7080

gctttttctc cgctccact cccagtccta gatttagcag ccatgtgtgg gtgggggcca 7140

ctgcagggat acttaccac ctaccagaga gatggcctgt gggctgctggc ctttctgagg 7200

ctgtggaggt tggaggtgt ggcagcctgg gcagtcaggc tgtggtctc ccatgttctt 7260

gactcctgct agtctgggct gcctcctgat taggggttgg atgctccagt tcttccctgg 7320

gttggggatt gccaccctac tcccagccca tccaggttca cgcttattcc aaagcggagc 7380
accagcagtg tgccctgctgc gggagttctc cgtgtccage ctgagggttg cctgccaaacc 7440
cctctgagag gtgcccggag gctgtgcgcc cacactgccc agcagtgcgg agaagcaggc 7500
ttgtttttcc ctgtcactgg cttggaagag atgctttgtt ctagggagcc gcatgtcccc 7560
ttgcctgcgt tgttggtgag gagccagcag gctccgtgga gggcaggcta gcagcctggc 7620
accagggagg caagggtctg agttcctagg aggggtggtg ctcatgtgag aagtctgcaa 7680
aggttactac tgagcaccat ctctctgtct gaaaaacatt tttcattttt ctgtgaacca 7740
ctaagtttcc cgittgggct ttcttcctgc ttttggtctt tgtttaggca ggcgtagcca 7800
gatecaagcg tctggctgct tccccatgct ttcagacctc tttttctgtt catggtaaact 7860
atagatggaa ccacacattg gaagctggaa actcaagcgg tgcagcctat tccttaccce 7920
aatccctggt ttacaaatgg ggaaatcaag gcacagcatg gggatgatgt tatctgaggt 7980
tggaagagtt aatagtagag tgggagctaa aaccagttt cttacctcca agctcagggc 8040
tttcagctgt aattgagcct agtatagttg gtgtgcagca tcagggattc cagctctaaa 8100

ggtcacaaaa aggacccggg ggtcattggc ccagggtggg aacctgagca gagcagggtcc 8160

agatggtgca ctctgtgccc tggecttagt ttcttgcctg atgctttggc ccgtagagcc 8220

ccagagccct gcttccagaa ccaactccagt gacgttcatg ccaatggcct gaaccccact 8280

gagcgagggt gccctgcctc ttccacagcc ctgggctccg ctcagatttt taggagcaag 8340

cgttagagge cttgctttct ccagggtcag catgtggaca gaacacttac tctctgcctg 8400

tctctectcc tcaaaatgga agcaagacag tggggcctac aatgctatga aaaacaggat 8460

gggaaagaag cctgctctct gccttcctgc ccaggtgagc catcacctga ctaagtgagt 8520

tcacactcag agcgtgtggg gatggcagga tgttctgact tcattttcca ggatgccttt 8580

gctttaaaac cttttaaaaa gaagtgaatg atacaccccc ttgctcatc ttgcagtga 8640

acctggtgtg tgaggacgac tggaaggccc cactcacaat ctccttggtc ttcgtgggtg 8700

tgctgttggg ctccttcatt tcagggcagc tgcagacag gtaaggtgtc tgtcttctgg 8760

agcaccaggg gacctcagca ctgaggaaga agcgtgtgcc tggcccttga tttcagttgg 8820

tagtattctt tcagcgcagg gccctgtatt ttaaagaaga ggaagctatg tctgtgatat 8880

agactccatg cctagtaaga agagccaaca aatcatctga ctccgtaatt cttgctaagt 8940

aaagaaacct gagctgtcta agctgaatgt atctgtgatc cggttgacta ggtaatatgc 9000

catgattcac ttctgcagta gcttggttg cctccccctgg gtcactgtga ctctgtcatg 9060

ccccgagca tgggagaggt tgacatcatg cacacatgca catgtgctag attgtagatc 9120

tgtagtagtg ccaagggtgc tgctctgta gtcccaagaa gaccagcatt ctctctgcaa 9180

agtгааagga gctctcacca gccactagtg gtatgaaaag cagaactctt ttgtccacaa 9240

ggctgatgcc ccttagctaa gtggcctgtg gttttggcat ttactttatg acaggaggga 9300

gaatagtgtt ttgateccatt tcttataagc aggttatttg tataattcta aagcttttaa 9360

ctcaaggaaa cattaacggc ttagagaatc ccaaaccct cgaaattata tgcacaatgt 9420

tagagactac atgtgagcat ttttttgag agaggtecggt agctttcatg aagttcttag 9480

aggggtccat tatgttgtgt ctctttccc tggagcttca gggctctgca gagaagactg 9540

tgaagagagt agcagccttc agcaagtcct tggccacatg gcacatgtga gaacacccca 9600

caaatcgggtg ggtagccgg tggaaaggag tcccagcatc ttccctggtt tttaattcct 9660

ggcctcaagc aatcctccct ccataacctc ccaaagtgt gggattacag gcgtgagaca 9720

ccatgcgcag ccagatattt tttattgttg ttgttttttt ttggaaaagg agtttcactc 9780

ttgttaccca ggctggagtg caatggcagc atctcggctc actgcaacct ctgcctccca 9840

ggttcaagag attctcctgt ctcagcctcc tgagttgctg ggattacagg catgcaccac 9900

catgcccage taattttgta tttttaatag agacaagggt tctccatgtt ggtcaggctg 9960

gtctcaaact cccgacctca ggtgatccac ccacctcggc ctcccaaagt gctgggatta 10020

caggcgcgag ccactgcacc tgcccagcca gatttttttt taaaaagcag gttaacctgt 10080

ttattattcc tactttacag atggagaaag tgagacagag ggattaaata acttcccca 10140

ggtttcacag ctggcaagtg gcagagttag gatttggacc caggtagtct tgctcctcta 10200

ttgtgtatgg actactgttc taggtccctg ctgtcctaaa acttgcttct tagcaaggtg 10260

gaatgtatta aacaaccaag tgaggaagtc gttgttgtcc ttggccatgg taagagatac 10320

agagaagtgc agggtgccac aggagtgtct aacagaggag gtcaggggca gcatccctga 10380

gaaggtgaag catgagcgag agtggaaga tgagtcgaaa gtagccagct gaggggtaga 10440

gaggagaaag aacatccagg cagggagaat agcaagtgt aaagccgggg ctcatgaaaa 10500

ggcatgggag caggacaaag tccgtgtggt agaggtgcgg agagtgggtg taagatgaag 10560

gggagaggca ggcagagccc tgggcagatg agcaaccagg gcttagtgga tcacagttag 10620

gactttgggc ttcagccaca gagcagcggg gggctactga gattttttta agcaatagtg 10680

tgacaatcag attgtcctt ttttttttt taaagatgt ttgacaacct tgtgaagaaa 10740

gaattgaagg gaagcaaaag gtgttgtaga gagaccaatt aaaaggttgt cacagtagtt 10800

catgccagag atgatggtgg catggcctag catgacgggt gtagaaatgg agggaagtgg 10860

taagaggtaa aatcaacaag acttgccgat gggctggatg tcggaattgg gggaagaaa 10920

ctttctggcc tgagtaactg ggtgaatgaa ggtacacttc tctaagacag agaatgctgg 10980

aaaagaacca cgttcatgga tattgagttc aatttgtgtg tactaaattt ggggtgacta 11040

tgagaccct aagtggagaa gtagagtgtg aagctggctg tatggatatg gtactgcatg 11100

agaggttttg gctagagaaa cacatgtagg attgtcagc atatagaacc ctcagcagag 11160

ccccagatag ggatgaggtt gcctggggag aggggagtgg ggaggggagg ggggaactgg 11220

gggaggattg tgctatgctt agaggccacc tgagtggaca tgggagattc cttctcacgg 11280

agctaagtga cagctgcggc tcagaagaat gcccttgatg tgaaaaggag ataccccaag 11340

ttcagagtag aaatgcagtg ttttttctg ggtcagctgt gtcatgggtc agcttaagaa 11400

cttcttgcc atgtgacaca atgattacct gaggaaagca ttttaagtcc aaaaggtcta 11460

ttcccaggga aagtggaaac aaaatttggt agtgtgttta ggaccacttt agtctacaga 11520

agggttaata tagtgttttt caaacctttc taaacatttt ggccacagaa ctttcattaa 11580

agtaggataa ttttaagtcta gtaaataaaa tacaccctaa gtggctaaaa gtatggctgt 11640

tctgcctgca gcccctgcct tcaattecca atgccctgcc tcaagcctgt ctgtgcccc 11700

ttggaaggcc cagggccctg tgggatggac agcttctgag tgcattactt ctgagtaaac 11760

cagttctaaa acctaagcta agtagattac ctgaaagcaa tcaattcatg ccctaacttg 11820

tctaggacat caatgtaact ttttatatag tataaagggt tcaccttctt tctggcctat 11880

gaatatgtct gaaattcaag agcaattaaa gtactcctgg gttgtcaaag ccttttatgt 11940

aacactattg agttatcttt atgcgtctga cttgtaagag atgcacaact ctaggaagaa 12000

gtagactgct gtgtcctggt tccaggtatg tgtgtgtttg ccattttggt gacagacttt 12060

aaaagcaaac atttctggcc ccaaccctga actgccaagg actggtgcta tgtaaagggt 12120

tctctggatc tgtctcttcc ctaccatccc agggagctct taggaaggga aaggcatag 12180

agattatacc agcctgcctt gtggttagga accaccctt ggttggcata tagaacatgc 12240

ttgttaaaaa aaccatgcag gggaaagtag agtctactac caggcgagag tttctcaacc 12300

tgcacctat taacattttg agccaaataa tttgtttcta gggcattttc ctgggcattt 12360

tagaatattt aacaacatat ctggcctcta ctcattagat gccagtgaac cccaagtgat 12420

ggaaaaaaaa aacaacaaca gaaaaaaaaacc tcttttattg aggaaaaaca ccaaactctt 12480

ccacatagtt gcaagacctt gtgcaatttg cctcctagcc accactgtac tcttgaattg 12540

cacgcctgat gccaacca ca ctggttctc atgttcacca tgccccctcc agccatgggg 12600

gtgtgtggtc ttctcagagt ctgaagcatt cccacccac cccaaccac cccctgtggc 12660

cttctttaac catgctggct aattcaggat ccctagttcc ttatgacttt cctttaaac 12720

gtctaccaga aattggggga aaaaaagtgt tattatagga ttaatgttgg tcttccccac 12780

tatactgtga atatcattga gagcttggtc cctacacett aaatccceca tcgtcaacta 12840

ttttttccca tctcagtgtc ccatgatcaa ggagaccctc cctgaatgtc cagttcccca 12900

accettaccc ccagtcagg gtagcttctt tcttgtgcc tctcattaac ctgcatgccg 12960

atccttcagt gcacttgact cagtgtgtaa ttgtatatc agtagcgtgt tgttagatta 13020

aatgtggtt aatatgtgtt tcaccagtta tactatgaca ctcttaagg gcagaaacag 13080

catctttttt aatttattga tatccaagt ccctctataa tagatgctca ataaacattg 13140

aatgaaagt ggtgtcagcc agtactggcc agactcaaac tgaaccact gtttccact 13200

agcttgactt tttctctctg ttgtggcac tctctttaaa acaaaccaaa ataaacccea 13260

ttttaaaaac tttttaaaat gagcacggat acagaaaacc acacagaaca aatgtgtagc 13320

ttaatgaatt ttttcagag aaataacct atgaccacca ccaagtcgag cagtagaact 13380

ttgctgtcca ctaagaagcc ctgtccatgt gcccacccc aattacagca tctctctct 13440

ctccccatta agtaaccgt agcctgactc ctgtaataat cacttccttg tgagtttttt 13500

tagttttatt atcgaaatat gcaccttga cacaattta gtgttgccca cttaatatat 13560

ttgatgtctt ttagtctact taatctatgg attctccttc tatgccttc tatgccttac 13620

tgattatcta tgaagaacct gagctattcc acctatagaa ttcccagtc tggatttggt 13680

gattgcacac tgatgatgca gttcagcaca ttctctatg ctctgcattt cctcaaaatt 13740

ggcagttgga tccagagact tgagattcag gttctgattc aggttcagtc cttttggcaa 13800

gaccatagga agcatgcaat tcttgactgt ctctttatga tgtaaacagt aattagtata 13860

taatgcatag atctattaat ccattggggg ctataaatgg tattattcta attttattac 13920

cttttcattt aaaagttaga atacttttgt acatgatact acctcttate tattattggt 13980

tgctgttcac atagtttaca aaggaaaatc aggacaaatg cttctttctc tttatttgcc 14040

agttttcatt tataatgaat tgtttctctg ttattctcca aatttggcag attctttttt 14100

aaaaaaaaata tcattatgaa tgtatggatt aaataattga tgtatttcag tctcttgcaa 14160

tcattatcat aattgtagca ttgcttttta ggcaaccctg gtaccaggc tgtacatttg 14220

tcatggggag tggggagggg gagaaatagc atgggcactg tgagaccgag actgtccctg 14280

gcagccagta ttctggcaac actgttcaca cccacttact ggatggatct tgagaaagcc 14340

ccacttggtg gageccattc ctgctgcctt ttccagctg gttatctgtc actctccttt 14400
tcttcccagg ttggccgga agaattgtgt gttcgtgacc atgggcatgc agacaggctt 14460
cagcttcctg cagatcttct cgaagaattt tgagatgttt gtcgtgctgt ttgtccttgt 14520
aggcatgggc cagatctcca actatgtggc agcatttgtc ctgggtatgg ccatcagggtt 14580
ggagttgagt acttgatcct gtatttcacc atcatcccat cacctacctt tctggagaca 14640
gctgtgatgt cctcaaggg ggacagggtt tctaacaaaa ctagccagag ctctctggtg 14700
aaccttactt acaggcaggg aaactgagcc agacatgaga ccagcctggg gtccccagca 14760
gcacaatggc ctgacttctg atttccagtt cttttctggc ctctgggctg tggtccttg 14820
gtcttagtac ttggtagtca atttactagg actcaccaga gatcctccat ttacaaaaag 14880
ggcctgccac tgcacagggc tgagccagcc ccagaaagag ggcggtatgg ttggaggagg 14940
aggggctgtg actggcaagc ttgctaaggt agagaacccc ttgtctgcag agcactgtgg 15000
ctggtgatat ctacggacaa gaataaattg ataggaaggg gctttcgtca ccttcagggt 15060
tttaattcag agtgcacact gcagggttt gtctcaaatg tgccagcctg ttgtcactga 15120

gaagctgcca ggccggcctg tgtttgagg aacctgactc tagctgataa ggctttgag 15180

ttccttggtg tgatattgtg aaagggttgt tttttctttt tatatttaatt attctttcct 15240

tgaggcttaa gtcagcatgt gctgacttag taatgacttc actttttaata aattcttctt 15300

catgtgagga tttaaaggggg cctaccatgg catcttttagc acatggcttc agaacatggc 15360

gaaattttca agagagaact gttgcttggg ggctgagag gccacaggga tgtaccccca 15420

ggagacagtc agacaggagg ggttcagaac gccatccgct ccctagcgcc atgaacttag 15480

agagagttct cgctgttttc ttgtctgtgt attcaciaag ataccataaa aaattaataa 15540

ggaaggaacc caaattaaac tgctaactcg acctcccttg tttgaacag ggacagaaat 15600

tcttggaag tcagttcgta taatattctc tacgttagga gtgtgcatat tttatgcatt 15660

tggtacatg gtgctgccac tgtttgctta cttcatccga gactggcgga tgctgctggt 15720

ggcgctgacg atgccggggg tgctgtgcgt ggcactctgg tggtagtgt gacctgtgc 15780

cccatgtgcc cactggcagg atgatttctg tctggccttc actagagggc agcaacaacc 15840

catgaatccc tattttgtct ccagagaca ggaagcatag attataaatt atttcagaat 15900

gttttctcca cactcaaaag agccaaaaca aaacagaatc ccatgacagc aacagacttg 15960

ctctcagccc tgtgctgggt tgccccaagt gtggggaaaa atagcagtag ctgtgagaag 16020

atgggggtcca gcatgccctg taggaagtgc ccaagcctca gggcaggaca gtgtaggccc 16080

tagttctggc tgtgtgctgc tgaagcctca tgccacaggc actggcacca aaagcaagag 16140

tcctcagggt agccacatgg aggaagccag gctccttctg caccaccaag gtagaggagt 16200

tgaacaggca gagaagaggc cattccagac caagagggga aactgcaga ggtgctaagg 16260

tggaatcac cccttgccagc tggagaaggt gagatcacca gcccaagtgg agcagagagc 16320

atttcagggc atagtgggag agtaagccgc acatcatggg gccagtcac gaccgagggt 16380

ggggggcggc tacctgggtcc cagcaagggt gaaaataata tccatagagc actcaagtgc 16440

cttgataaac atgctaattt ttttcctttt tttcttttct ttttcttttt ttttcttttt 16500

tttttctcag acaaagtctc tgttgcccag gctgtagtgc agtggcgtga tttccactta 16560

ctgcaacctc cgcctcccca gttcaagcga ttctcatgtc tcagcctccc gagtagctgg 16620

gactacaggt gcctgccacc gcacttggtt aatTTTTTTT gtattttctt ggagagacgg 16680

gtttcactgc gttggccagg ctggtctgga actcctagcc tcaaatagc caccggcctt 16740

ggcctcctaa agtgctggga ttataggagt gaaccactgc acctggccaa acatgctatt 16800

ttaggtagag tatctgacta atctgttgga taaatcaggg gtagggtgag gagagaagag 16860

aagctaaaag gccagtgcag aagcttctgt tgggtgccggg gacagggagg agagtgtagc 16920

agggcctggg ctgacataga catgcacaga agccaggctt ccgagccca tcttgaccc 16980

atctcctcag cccagcagat ggcaacactg ctcttcagaa atggaggtgg ccagccagca 17040

tggggatgcc gtcagggggg gcagggtctt cccatttttg tgcgggtgtg ggtacacata 17100

agctcatcca ccccagggtta ttgctgcgtg tggatcagct ctttgcttct ggcttgtgat 17160

caccaaacaat tccacaagct ctggttctgc aaccttattc ccacctatgg ctgtgctcta 17220

cctggtctgt gggctctgctg ttggcaggga ggctcactg agattggacc ttgtactgcc 17280

aggttcatcc ctgagtcacc ccgatggctc atctctcagg gacgatttga agaggcagag 17340

gtgatcatcc gcaaggctgc caaagccaat gggattgttg tgccttcac tatctttgac 17400

ccgagtgagg taagcaccat gtgggtgtgg gtgagaggga cagactgacc gtgatttgag 17460

agcagcagca cccagccctg aagtcctccc tgctcacagc agcccagccc tctctctgcc 17520

caagccccaa ctgcccatc ccccatccc cccactcccc acccccacac gggccctggt 17580

aacactcaga agttgaggaa taggttacag ctgcctcact cttttcacca cgggtttcag 17640

attttcattt tttacttctt ttctaggcaa tcatatatat taaccattac ttctaacaat 17700

aaatactctt ttgagtaat aggcctttca taaagtcagc atttgggaaa atcattgttt 17760

cttataccta aggtggcttg tcaccttaca aagctaacce caaacgtaaa atgtaaagca 17820

caaatagatt tggagttaga agtatttcat ctcttgagta ttagcaatta ttcattaaaa 17880

agaaaaaaaa agtgtttagt ctctttctgc cctccaatgg ttaattattg catatcatct 17940

tggagtcagg tcctttttga tgccacctc tccccctac cccaccctc cgtcagccc 18000

tggtctcaca caccatgact catttcttgg ctctacctag ttcttggttc ttgcttttcc 18060

ttcccgttcc ctctectacc atctctgtag caggcagttt tccttggtct cgtgactatg 18120

agaggttaga agctgtaaat gctgcctggt ggggttcttg aatgtgtctg tggctctgact 18180

ggaagatgag gggttgggtg tgggaacagc cacaagcagc cctgctgaag tgtgagaggc 18240

aggcatggtt gggcttgga aagaggaac agttattgta gacagcgag gccaatggcc 18300

actgccagcc ctgcagactt cccagtgagt ggtggcccag cagccactgt cagcatgcac 18360

cagaaagggg tcctgtgccc aaaggtcagg caggagtgtg gcagagggtt ttttaagttag 18420

gtggttttgg gggcttttaa gtgaggggtc aatctgggtg aatgcataag cccactggc 18480

atctttgagg aaatgaggct atttcagggg ataactttcag tccaaagttg accttttggt 18540

gaacttctaa ctctggaaaa acaagctcca aacctgggtt tgcttaagaa agcaacatca 18600

gtgtgtttag acgtgtggtt tattaatggc cttggctgtg ctgaatttca taggaagtca 18660

ctctgggtga agctcaggtc aattttcctg tttttctatt tgaattcttt ttccctggaa 18720

gcacaccagt aactacatag tataaggact caaacatta acttttaaaa aatatcagac 18780

caataaacca cacagccagg tactctctct gaccagagg gcaggagcc aggtctcggg 18840

aggaatactt agaggcctcc ttggaatgtg gccaccgaca ggaatatgtg ggggtgcagt 18900

gaggaagctg tcagcctggg cctctgtctt cctgtaccct tgagggactg gtcacttact 18960

tttctcatt ttcatteact ctgatttggt actgacaagg cctaggaag ttttcacage 19020

ctaaaacaca gtcagtatac ttactgttct tagaaacgta acactccccg acgctgagat 19080

gcagacagct aagatgccag ggattcaagt atgttattgt gtgctctgag tctctgacca 19140

cctcttcttc ccatacactt atgatgttgt tctgcagtt acaagaccta agttccaaga 19200

agcagcagtc ccacaacatt ctggatctgc ttgaaacctg gaatatccgg atggtcacca 19260

tcatgtccat aatgctgtgg tatgtaaaag agacctgcct gaggttcca gacaaagctt 19320

cttgaagtgg ccattgggcc tcttgtttac agacatgcct cagacaaaat tcaaagccta 19380

tgtcatcaga gagtgaag gatatgtctt gtgttagatg gaaaaaatgg gcatgtcaca 19440

attcttaatg ggatggaacc tcagaaaagg agaataaaaa caattgtgga ggctgttg 19500

ggaaatatgg actctcgtgg ggaatctctc cagatcttaa gatgaatcct tgcccaattt 19560

gggtcattta gtcccgctt cctaccagct taccgacagt ggctgaggag gccaggtagg 19620

gcttttaaga aggatctgag tgaagacacc atgtcctgta ggctgcagag gctgccagtt 19680

actttctgga aatgtggaag tgggatgtgc tctcctggg atgtccataa acggtcctgg 19740

agtcagggt atagcctaga tgtccttacc aggttccac taatgaggca aagtatgtca 19800

gaaagggatt tgtgaattac caggagagagg aaacatgtcc aagtgcacat cgctagcttt 19860
tgctcagcgg ccgaaccctg ggattctagg cgacttctgg agcctgggtg gttagcgggtg 19920
agaagatggg cgaggagggc ggacttcac tcagagtcct tattactagt ctcacccagc 19980
tttgaggcag tcagccactg tgcctactga gggagtgtta tgagtcaccc gcttccaagg 20040
aatggcccag gatccctcca ggcagttcac cattccctga gttggcctca agacaggagc 20100
agcatgtagc ctgcaccaca gacatgcaag cctgtgatga gtcacccact ttgtgttca 20160
cccaggctct cctccctgct ctggatttcc tggggactca tgcacatact ctttttattg 20220
taccagctgt gtgttcacc tgcagatgag tcaaaacagt ctaatccata aaggtctggt 20280
ttgtcaaaga gtgtgggtca tcaacagaga gaatgcctac tggggatgcc caggtcaggg 20340
gtactgcagg gcacccctgat gagaggcagt gtggccctc cattgggagc cacctctctg 20400
ctccacaagt accgcggggc tgggtgtcagc tgtctctgac cagcctcttc ctgactggtc 20460
accacaggta gtgtgtgagg gtctctctcc aagtgtttga cctaagtgtg ttccttttgt 20520
tatcttatcc cccaaatcct atcacacctc acttgatgtc tgcctcctga ctcattctct 20580

agctccttct gcagttgctg gatttgagga ggttcagctt aggattttta aagctgaaag 20640

gcaggttgga atttttcttt tcaatgaagt aaatctatct gaattataca agcttttttg 20700

ctgggacact gtctatatgg aaggctctga gagcgactg ggcaggggtt tacactgtac 20760

cacttgggct ggggaaaatt atcttttgat ctatgaagta agacgcaggg ttacagttac 20820

tgctgcctta ctagtctctg cttaaagatg gtttggaatt tactgaaata attgcattgt 20880

aaaagttgta caggttgga aagatgtgga tactgctttt ccagctttct tctgactct 20940

gtttcaggat gaccatatca gtggctatt ttgggctttc gcttgatact cctaacttgc 21000

atggggacat ctttgtgaac tgcttccttt cagcgatggt tgaagtccea gcatatgtgt 21060

tggcctggct gctgctgcaa tatttgcccc ggcgctatc catggccact gccctcttcc 21120

tgggtggcag tgccttctc ttcatgcagc tggtaacccc aggtagggaac catgtgcac 21180

tatggtttgg ggtcttcact gagtctctta ctgtctacca ggctgtctca attaataaag 21240

agaataaaat caagcccatc acagctccct tgcttatata cattcttggc ctaaaaatca 21300

atagaaagtg tcttctgaga ctagaacact tatggcctgg gctttgaggg agtgggaaaa 21360

agcagccatt ggggctgttg gttaatttta ctctgtaccc aagttaatgt gtcatactg 21420

ttttccactg cagaagaaga gggaagaaat agctatccca ttcttttttt tcttgccct 21480

gtctttcttta ttattcaac aaatagctat ggcatgccta ccatgggctg ggcactgtgc 21540

tgggtgataa cgatacaca gaaaacaagc caggcagaac cccaggccct catggaacgt 21600

acaccctaga tgagaagaca gacaacaaac aagtaaataa aatgcttaat atagttcaga 21660

ctgtgttacc ttctaggaat acaaatgaag gacaatgccg agttagtta catagtcaca 21720

gatagtgtcc ctgaacaggg ggcagttcag tagaaatgta cataaagtga cagaaagccc 21780

tgaaaaagtc taggagaaca ttttaggaag aagaaatggc aaaggcagcg accctgagca 21840

ggggatgagc ctggcatgtt tgaggaggag ggagaagggg aggggccaga ccaactgagag 21900

ggcctcacag acccttagca ggattttatt tctgaaacta tcttagtate ccacagatgg 21960

gtgggaggta gccatttcca ataatttata gaacagttca tgggccctca tctctccctc 22020

tccatcactg tgcccagaga cttcagtgtta cctgtagatt tgggagcctc tgatggtcac 22080

ttttgggccc atcaggctga gaacactgca cggaacagc tcccatggg atgtggcagg 22140

aggagcccag aactgatgta gaggtcacac gctgagctca gactgacctt caggtcacac 22200
atagctctcc catcagcaca gcacagagag attagaagat caactcgaga ttctgatggc 22260
ctatgatttt tttaggtctt gactgggagg aaagcatgaa atgagttaga actgaattct 22320
ccattcatct aaacatcatg agttaattcc atagtgcctg cagtgtgagg ttctgggggtg 22380
acagttaatc cctgacagac atgtctttta tgacttatag actgggaagc aggttgattg 22440
gactattaag gagcttactc tgggtgtctc caggttgagg aaagtgcatt tccttatagc 22500
tgcaggctcc agcctccttt cagcaatcaa tttagaggga aatcttggtt atagcccctt 22560
ccccacaat aggaagtgat agaaactgac tccccaaaaa atttggaagc aaagtatggt 22620
tgttttgtct tcaatagctg catgccatgg gttggtacct actctaccc tcttctctt 22680
gcttctccag acttgattta tttagctaca gtctgtgtga tgggtggcaa gtttgagtc 22740
acggctgcct ttccatggt ctactgtac acagccgagc tgtatccac agtggtgaga 22800
aacatgggtg tgggagtcag ctccacagca tccgcctgg gcagcactct gtctccctac 22860
ttcgtttacc ttgtaagtc ccatgagcca agggcacact agagcaacgg gatggaagta 22920

ctaactggct tgaatgtgag ctggagggtg cgtgttaaca gaaaacaag ttcatacagt 22980
acatgggctc catccagtac tggatctttg gccgggaagg gttcttgtcc cagtgcactg 23040
gccctcactt tcaaatggaa aacaacctat agattaccta gaaattgatg agaattattg 23100
agggtttgtt tctgttttag ccatcccagg ctttccatca gagactacaa ttcctttatc 23160
ctaagaacct acagagtggc ttagggagcc agtgtgctta gttggagaaa tttcttggaa 23220
tcagagttta aaaggaacat gaggggaaag atgtccatgc aagaggtctg atgaacgtaa 23280
aattattata acctagagca ctatagagtg attttatctt gtgtgaagat ccaccccatg 23340
ccattttatg tagcaggtct ccagttttct cttctcagaa ttatgtcttc atagcacctg 23400
tggtttccct gcacatccct agccagtacc tctttaggga gggtagcacc cacctgagag 23460
tactcagagt gctttgtgaa catgctatgt agatctcaaa gcaagcaaaa gcaccctgcc 23520
taatctgaag gcagatcaca tgggctggga cacatctgca gaggtggaag agttatttcc 23580
atccctggac aagtacctca ggttccttgg aaaccaacc ttggtaaata agaataatca 23640
gcatggccca gaaataggaa taatcagcat ggcccagctc ttctcctgca accgcccctt 23700

tgtactcctc cctgcatgg tggaacactg ctgggetctg ggcatgectg tgccagctct 23760
gggttctgaa acctgtctag atgccagatt ctaatctgac tgctcagact gtgagagatg 23820
tgagaccaag aaggaaagt atccccctcc agagtcttg gagcataaag gggtagatga 23880
gagaccaagt ctaactgcag cctggggcct gaggtctcgt ctgctttgcc ataggtgcct 23940
acgaccgctt cctgccctac attctcatgg gaagtctgac catcctgaca gccatcctca 24000
ccttgtttct cccagagagc ttgggtaccc cactcccaga caccattgac cagatgctaa 24060
gagtcaaagg gtaagaagac ctctctgtc agtgttgatg cactgggtct gggtctggcc 24120
aggtctcagg agccccctac aatagagcta ctgcgaaact cctctcaca gacaccatgg 24180
actagtttag ccattaaagg gttgtaaatg gcaaggtgct tacttatagc ccctctctc 24240
tggtctgttc ctgtgtggac atgtcactat acacatctcc atggcagtag ccgcactgga 24300
taactcagag gctagaagaa acctttcaga atctgctgca ggattctctt cccaggaag 24360
atactctcag ttcttgtttg ttgggagact gggaggcatc tttttaaaat gtgttactga 24420
catatttttg cttgttttta tagaatgaaa cacagaaaaa ctccaagtca cacaaggatg 24480

ttaaaagatg gtcaagaaag gcccacaatc cttaaaagca cagccttcta acatcgcttc 24540
cagtaaggga gaaactgaag aggaaagact gtcttgccag aaatggccag cttgtgcaga 24600
ctccgagtcc ttcagtgaca aaggcctttg ctgtttgtcc tcttgacctg tgtctgactt 24660
gtccttgat gggcacccac actcagagge tacatatggc cctagagcac caccttcctc 24720
tagggacact ggggctacct acagacaact tcacttaagt cctaactatt acaatgatgg 24780
actcagcacc tccaaagcag ttaatttttc actagaacca gtgagatctg gaggaatgtg 24840
agaagcatat gctaaatgta cattttaatt ttagactact tgaaaaggcc cctaataagg 24900
ctagaggtct aagtececca cccctttccc cactcccctc tagtggtgaa ctttagagga 24960
aaaggaagta attgcacaag gagtttgatt cttacctttt ctcagttaca gaggacatta 25020
actggatcat tgcttcecca gggcaggaga gcgcagagct agggaaagtg aaaggtaatg 25080
aagatggagc agaatgagca gatgcagatc accagcaaag tgcactgatg tgtgagctct 25140
taagaccact cagcatgacg actgagtaga cttgtttaca tctgatcaaa gcactgggct 25200
tgtccaggct cataataaat gctccattga atctactatt cttgttttcc actgctgtgg 25260

aaacctcctt gctactatag cgtcttatgt atggtttaaa ggaaatttat caggtgagag 25320

agatgagcaa cgttgtcttt tctctcaaag ctgtaatgtg ggttttgttt tactgtttat 25380

ttgtttgttg ttgtatcctt ttctccttgt tatttgcctt tcagaatgca cttgggaaag 25440

gctggttcct tagcctcctg gtttgtgtct tttttttttt ttttttaaac acagaatcac 25500

tctggcaatt gtctgcagct gccactggtg caaggcctta ccagccctag cctctagcac 25560

ttctctaagt gccaaaaaca gtgtcattgt gtgtgttcct ttcttgatac ttagtcatgg 25620

gaggatatta caaaaaagaa atttaaattg tgttcatagt ctttcagagt agctcacttt 25680

agtccgttaa ctttatggg tgatattttg tgttcagtgt aattgtcttc tctttgctga 25740

ttatgttacc atggtactcc taaagcatat gccacacctg gttaaaaaag aacaaacatg 25800

ttttgtgaa agctactgaa gtgccttggg aaatgagaaa gttttaataa gtaaaatgat 25860

tttttaata t 25871

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

59/68

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

gcaggaccaa ggcggcggtg tcag

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

agactagagg aaaaacggga tagc

24

<210> 8.

<211> 24

<212> DNA

60/68

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

agatttttag gagcaagcgt taga

24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

gaggcagaca ccgtggcact acta

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

61/68

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

ttcacaccca cttactggat ggat

24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

attctgtttt gttttggctc tttt

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

agcagggcct gggctgacat agac

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

aaaggacctg actccaagat gata

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

63/68

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

tctgaccacc tcttcttccc atac

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

gcctctcag ccactgtcgg taac

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

64/68

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

atgttggtcc tttgttatc ttat

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

cttgttttct tgtgtatcgt tate

24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

65/68

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

tatgtttgtt ttgctctcaa tagc

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

tctgtgagag ggagtttgcg agta

24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

66/68

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

tacgaccgct tcctgcccta catt

24

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

tcattctgct ccattttcat tacc

24

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

67/68

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

gataagctta cgggtgtcccc ttattcccat acg

33

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

cccatgccaa caaggacaaa aagc

24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 24

tgttttttcgt ggggtgtgctg atgg

24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 25

acagaacaga aaagccctca gtca

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04853

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68, C12P21/02, A61K48/00,
A61K38/17, A61K45/00, A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68, C12P21/02, A61K48/00,
A61K38/17, A61K45/00, A61K31/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG)
WPI (DIALOG)
GenBank/GenBank new/GeneSeq/pir

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THE Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 32, (August, 1998), Tamai I, Ohashi R, et al., "Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2.", p. 20378-20382	1-9
Y	Biochemical and Biophysical Research Communicayions, Vol. 46, No. 3, (May, 1998), Wu X, Prasad PD, et al., "cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family.", p.589-595	1-9
PY	WO, 99/13072, A1 (CHUGAI RES INST MOLECULAR MEDICINE INC.), 18 March, 1999 (18.03.99), Full text	1-9
A	FEBS Letters, Vol. 408, No. 2 (May, 1997), Masuda M, Kobayashi K, et al., "A novel gene suppressed in the ventricle of carnitine-deficient juvenile visceral steatosis mice.", p. 221-224	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 November, 1999 (17.11.99)

Date of mailing of the international search report
30 November, 1999 (30.11.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68, C12P21/02, A61K48/00,
A61K38/17, A61K45/00, A61K31/70

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68, C12P21/02, A61K48/00,
A61K38/17, A61K45/00, A61K31/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

GenBank/GenBank new/GeneSeq/pir

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	THE Journal of Biological Chemistry, 第273巻, 第32号. (8月.1998), Tamai I, Ohashi R, et. al., 「Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2.」, p. 20378-20382	1-9
Y	Biochemical and Biophysical Research Communicayions, 第46巻, 第3号. (5月.1998), Wu X, Prasad PD, et. al., 「cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family.」, p. 589-595	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 11. 99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

斉藤 真由美

4 N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P Y	WO, 99/13072-A1 (CHUGAI RES INST MOLECULAR MEDICINE INC.) 18. 3月. 1999 (18. 03. 99) 全文	1-9
A	F E B S Letters, 第408巻, 第2号. (5月. 1997), Masuda M, Kobayashi K, et. al., 「A novel gene suppressed in the ventricle of carnitine-defi cient juvenile visceral steatosis mice.」, p. 221-224	1-9